

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA CRISTIANE DOS REIS

PARTICIPAÇÃO DOS FATORES NEUOTRÓFICOS,
FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO E NEUOTROFINA-3,
NO PROCESSAMENTO NOCICEPTIVO OROFACIAL EM RATOS

CURITIBA

2016

RENATA CRISTIANE DOS REIS

PARTICIPAÇÃO DOS FATORES NEUOTRÓFICOS,
FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO E NEUOTROFINA-3,
NO PROCESSAMENTO NOCICEPTIVO OROFACIAL EM RATOS

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em farmacologia, no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana G. Chichorro

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Reis, Renata Cristiane dos

Participação dos fatores neurotróficos, fator de crescimento do nervo e neurotrofina-3, no processamento nociceptivo orofacial em ratos. / Renata Cristiane dos Reis. – Curitiba, 2016.

106 p.: il.

Orientador: Juliana G. Chichorro

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Neurotrofina 3 2. Neuralgia do trigêmeo 3. Hiperálgia 4. Fator de crescimento neural I. Título II. Chichorro, Juliana G. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.87




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

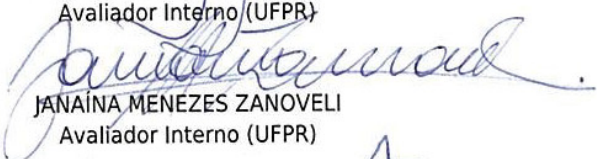
TERMO DE APROVAÇÃO

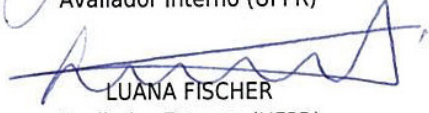
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **RENATA CRISTIANE DOS REIS**, intitulada: "**PARTICIPAÇÃO DOS FATORES NEUROTRÓFICOS, FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO E NEUROTROFINA-3, NO PROCESSAMENTO NOCICEPTIVO OROFACIAL EM RATOS**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação.

Curitiba, 21 de Outubro de 2016.


JULIANA GEREMIAS CHICHORRO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ALEXANDRA ACCO
Avaliador Interno (UFPR)


JANAINA MENEZES ZANOVELI
Avaliador Interno (UFPR)


LUANA FISCHER
Avaliador Externo (UFPR)


WALDICEU APARECIDO VERRI JUNIOR
Avaliador Externo (UEL)

*Dedico essa tese à minha mãe, Ana Dias da Mota,
com todo o meu amor e admiração,
por tudo o que ela me ensinou a ser e a valorizar.*

Agradecimentos

À minha orientadora e amiga, Juliana Geremias Chichorro, por sempre ter estado presente e disposta a compartilhar o conhecimento científico que possui, por ter me ensinado a identificar e a valorizar o conhecimento que cada resultado obtido nos traz, pela generosidade com que me acolheu em seu laboratório, por todo apoio e carinho que me deu durante os momentos mais difíceis.

Aos professores titulares e suplentes da banca examinadora por terem contribuído significativamente para o aprimoramento desse estudo e também para a minha formação como pesquisadora.

Ao professor Aleksander Roberto Zampronio por ter despertado meu amor pela farmacologia, por ter colaborado de forma relevante para a minha formação científica ao me orientar em estágios voluntários, na iniciação científica e no mestrado, por ter me ensinado a importância de questionar sempre, contribuindo assim para o meu aprimoramento profissional e pessoal.

Aos professores do Departamento de Farmacologia que desde meu período na Graduação demonstram comprometimento com a minha formação profissional.

Aos amigos de laboratório Carina Nones, Caroline Kopruszinski e Débora Aguiar que colaboraram diretamente nos experimentos realizados nesse estudo.

À minha chefia do hospital e amiga, Gisela M. Lucas, por ter possibilitado que meu horário de trabalho se tornasse flexível nos momentos mais críticos, e por todo incentivo, compreensão e carinho oferecidos nesse período.

Aos amigos que simplesmente cruzaram o meu caminho, aos de "toda a vida", aos que encontrei no HC, na Farmacologia, na Tenda Espírita, por sempre trazerem alegria para o meu coração e por me apoiarem nas escolhas, mesmo quando não concordam com elas.

Às minhas irmãs Rozemeire, Rozeli e Rosana e meu irmão-sobrinho Raphael, por me darem apoio incondicional em todos os desafios que preciso enfrentar e por me amarem sem pedir nada em troca.

Ao meu irmão Renato, ao meu pai Waldemar e aos meus cunhados Nika e Mauro por todo incentivo e carinho.

Ao meu cunhado Carlos por sempre se dispor a me ajudar e por cuidar de mim com carinho sempre que preciso.

*Como acabar
Com essa dor tirana
Que me atravessa noite e dia
Que mina minha alegria
E me deixa quase insana?*

*Novalgina, acupuntura, endorfina,
Xilocaína, morfina,
Benzedeira, novena, Cafuné,
Beijo de mãe, chá de pajé...
Como acabar com essa dor tirana?*

*Entre a crença e a ciência,
Eu não sei o que escolher!*

*Penso cá com meus botões:
Água benta, se não cura, não mata;
Mas e as drogas testadas em ratos?*

*Seu Doutor!
Pode lá o rato me representar?*

RozeMeire dos Reis

RESUMO

Existem evidências pré-clínicas de que o factor de crescimento do nervo (NGF) contribui para a hiperalgesia inflamatória na região orofacial, porém, os mecanismos subjacentes ao seu efeito hiperalgésico, assim como seu papel na dor neuropática trigeminal, requerem uma investigação mais aprofundada. No presente estudo foi investigada, inicialmente, a capacidade do NGF para induzir hiperalgesia ao calor na região facial, assim como o envolvimento dos receptores tirosina quinase (Trk), dos receptores de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) e de mastócitos locais no efeito pró-nociceptivo do NGF. Além disso, foi avaliado o papel do NGF na hiperalgesia térmica e mecânica num modelo de dor neuropática trigeminal. A administração de NGF no lábio superior de ratos naïve foi capaz de induzir hiperalgesia ao calor de longa duração. O pré-tratamento com um anticorpo anti-NGF, com um inibidor de receptores Trk ou com um antagonista de receptores TRPV1 foi capaz de atenuar a hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF. Também a redução da responsividade dos mastócitos locais, induzida pela degranulação prévia dessas células através da administração repetida do composto 48/80, atenuou a hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF. Num modelo de dor neuropática trigeminal, o tratamento local com anti-NGF reduziu significativamente a hiperalgesia ao calor. Além disso, foram detectados níveis aumentados de NGF no nervo infraorbital ipsilateral à constrição, no período de tempo em que é observado o pico da hiperalgesia ao calor neste modelo. No entanto, a administração local de NGF não foi capaz de induzir hiperalgesia ao frio ou hiperalgesia mecânica em animais naïve. Além disso, o tratamento local com anti-NGF não foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio ou a hiperalgesia mecânica num modelo de dor neuropática trigeminal. Em relação à neurotrofina-3 (NT-3), tem sido sugerido tanto um papel pró- quanto um papel antihiperalgésico para esta neurotrofina. Até o momento, o efeito da NT-3 sobre a dor mediada pelo sistema trigeminal não foi investigada. No presente estudo, o tratamento local com NT-3 não alterou a responsividade basal de animais naïve frente à estimulação por calor da região facial, mas reduziu a hiperalgesia ao calor induzida pela administração de NGF ou capsaicina. Além disso, num modelo de dor neuropática trigeminal, a NT-3 atenuou a hiperalgesia ao calor, possivelmente através de uma ação mediada por receptores Trk, uma vez que a administração prévia de um inibidor desses receptores bloqueou seu efeito anti-nociceptivo. Além disso, foram detectados níveis aumentados de NT-3 no nervo infraorbital ipsilateral à constrição, no período de tempo que representa o pico de hiperalgesia ao calor. Em adição, a associação de NT-3 e anti-NGF em doses ineficazes, determinadas nesse estudo, também reduziu a hiperalgesia ao calor nesse modelo. No entanto, o tratamento local com NT-3 não foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio e a hiperalgesia mecânica num modelo de dor neuropática trigeminal. Os resultados sugerem que o NGF é um mediador proeminente de hiperalgesia no sistema trigeminal e que pode representar um alvo terapêutico potencial para o controle de condições dolorosas orofaciais, incluindo a neuralgia do trigêmeo. Diferentemente, os resultados revelaram um papel anti-nociceptivo para a NT-3 no sistema trigeminal, o que a torna uma ferramenta farmacológica promissora para controlar síndromes dolorosas na região orofacial.

Palavras-chave: NGF, neurotrofina-3, dor neuropática trigeminal, hiperalgesia.

ABSTRACT

There is pre-clinical evidence that nerve growth factor (NGF) contributes to inflammatory hyperalgesia in the orofacial region, but the mechanisms underlying its hyperalgesic effect, as well as its role on trigeminal neuropathic pain, require further investigation. Herein it was investigated the ability of NGF to evoke facial heat hyperalgesia and the involvement of tyrosine kinase receptor (Trk), transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and mast cells in NGF pronociceptive effects. Additionally, the role of NGF in thermal and mechanical hyperalgesia in a model of trigeminal neuropathic pain was evaluated. NGF injection into the upper lip of naïve rats induced long-lasting heat hyperalgesia. The pre-treatment with an antibody anti-NGF, a Trk receptors inhibitor or an TRPV1 receptors antagonist attenuated NGF-induced heat hyperalgesia. Besides, a reduction in the mast cell responsiveness, induced by previous degranulation of these cells through repeated injections of compound 48/80, also was able to attenuate NGF-induced hyperalgesia. In a rat model of trigeminal neuropathic pain, local treatment with anti-NGF significantly reduced heat hyperalgesia. Additionally, increased NGF levels were detected in the ipsilateral infraorbital nerve branch at the period that represents the peak of heat hyperalgesia. However, NGF injection into the upper lip of naïve rats did not induce cold or mechanical hyperalgesia. Besides, local treatment with anti-NGF was not able to reduce cold and mechanical hyperalgesia in a model of trigeminal neuropathic pain. In relation to NT-3 effects, both anti- and pro-hyperalgesic roles have been considered for this neurotrophin. As far as we are aware of, the effect of NT-3 on trigeminal mediated pain was not investigated. In the present study, local treatment with NT-3 did not alter rat responsiveness front to heat facial stimulation, but reduced heat hyperalgesia induced by NGF or capsaicin. In addition, in a model of trigeminal neuropathic pain, NT-3 attenuated heat hyperalgesia, possibly through an action on Trk receptors, since the previous administration of a Trk receptors inhibitor blocked its anti-nociceptive effect. Additionally, increased NT-3 levels were detected in the ipsilateral infraorbital nerve branch at the period that represents the peak of heat hyperalgesia. The association of NT-3 and anti-NGF at ineffective doses, determined in this study, also reduced heat hyperalgesia. However, local treatment with NT-3 could not reduce cold or mechanical hyperalgesia in a model of trigeminal neuropathic pain. The results suggest that NGF is a prominent hyperalgesic mediator in the trigeminal system and it may represent a potential therapeutic target for the management of orofacial painful conditions, including trigeminal neuropathic pain. In contrast, the results reveal an anti-nociceptive role for NT-3 on trigeminal system, which makes it a promising pharmacological tool to control orofacial pain syndromes.

Key-words: NGF, neurotrophin-3, trigeminal neuropathic pain, hyperalgesia.

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 SISTEMA SENSORIAL TRIGEMINAL	14
2.2 DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL	18
2.3 FATORES NEUOTRÓFICOS.....	24
2.3.1 Evidências da participação do NGF e da NT-3 na nocicepção	27
3 HIPÓTESE DO ESTUDO	34
4 OBJETIVO.....	35
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5 MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 DROGAS E DILUENTES	37
5.2 ANIMAIS	38
5.3 AVALIAÇÃO DA RESPONSABILIDADE FRENTE À ESTIMULAÇÃO DA REGIÃO FACIAL POR CALOR	38
5.4 AVALIAÇÃO DA RESPONSABILIDADE FRENTE À ESTIMULAÇÃO DA REGIÃO FACIAL POR FRIO	39
5.5 AVALIAÇÃO DA RESPONSABILIDADE FRENTE À ESTIMULAÇÃO MECÂNICA DA REGIÃO FACIAL	39
5.6 REDUÇÃO DA RESPONSABILIDADE DE MASTÓCITOS	40
5.7 CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL	40
5.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE NGF E NT-3	41
5.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	42
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6 RESULTADOS	48
6.1 HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA NA REGIÃO FACIAL PELA ADMINISTRAÇÃO DE NGF EM RATOS NAÏVE	48
6.2 MECANISMOS ASSOCIADOS À HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA PELO NGF NA REGIÃO FACIAL DE RATOS NAÏVE .	50
6.3 PARTICIPAÇÃO DO NGF NA HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL ...	53
6.4 NGF NÃO INFLUENCIA A RESPONSABILIDADE DE RATOS NAÏVE OU SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL (CION) FRENTE À ESTIMULAÇÃO DA REGIÃO FACIAL POR FRIO	55
6.5 NGF NÃO INFLUENCIA A RESPONSABILIDADE DE RATOS NAÏVE OU SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL (CION) FRENTE À ESTIMULAÇÃO MECÂNICA DA REGIÃO FACIAL	57
6.6 NT-3 NÃO MODIFICA A RESPOSTA DE ANIMAIS NAÏVE FRENTE À ESTIMULAÇÃO DA REGIÃO FACIAL POR CALOR .	59
6.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA NT-3 SOBRE A HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA NA REGIÃO FACIAL PELA ADMINISTRAÇÃO DE NGF OU CAPSAICINA EM RATOS NAÏVE	61
6.8 PARTICIPAÇÃO DA NT-3 NA HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL ...	63

	Pág.
6.9 PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES Trk NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA NT-3 FRENTE À ESTIMULAÇÃO POR CALOR DA REGIÃO FACIAL DE RATOS SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL	65
6.10 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE DOSES INEFICAZES DE NT-3 E ANTI-NGF NA HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL	67
6.11 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA NT-3 NA HIPERALGESIA AO FRIO E MECÂNICA INDUZIDAS PELA CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL	69
7 DISCUSSÃO	71
7.1 INFLUÊNCIA DO NGF NO PROCESSAMENTO NOCICEPTIVO TRIGEMINAL	71
7.2 INFLUÊNCIA DA NT-3 NO PROCESSAMENTO NOCICEPTIVO TRIGEMINAL	77
8 CONCLUSÃO	83
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO 1. COMPROVANTE DA APROVAÇÃO DO ESTUDO PELA CEUA/BIO	106

1 INTRODUÇÃO

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a define como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual atual ou potencial, ou descrita em termos de tal dano (MERSKEY e BOGDUK, 1994). Cada experiência de dor vivenciada por um indivíduo é única, pois é o resultado da influência de fatores físicos, psicológicos e sociais, os quais irão determinar a forma que a mesma será expressa pelo indivíduo (MERRIL, 2007; TENEMBAUM et al., 2001).

A dor pode ser classificada temporalmente como aguda ou crônica. Para ser considerada crônica, a dor deve durar de semanas a meses ou durar um mês a mais do que o esperado com base na característica da lesão ou doença, de maneira contínua ou intermitente (ARNOLD et al., 2012).

Fisiologicamente, a dor pode ser dividida em somática, neuropática ou psicogênica. A dor somática resulta da estimulação de nociceptores em decorrência de lesão tecidual e inflamação e, geralmente, termina quando estas são resolvidas. Por outro lado, a dor neuropática, definida pela IASP como sendo a dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial (FINNERUP et al., 2016), é de difícil manejo e por isso grande parte dos tratamentos visa controlar sua intensidade e a frequência das crises, ao invés da cura (BARON et al., 2010; DE ROSSI et al., 2013; IWATA et al., 2011; NICKEL et al., 2012).

A dor psicogênica, por outro lado, é geralmente inconsciente, podendo estar associada a doenças psiquiátricas ou ainda ser decorrente da forma como o indivíduo lida com o estresse relacionado à sua doença. Pode também ser descrita como uma experiência de sofrimento mental na ausência de alguma doença orgânica ou quando a doença presente passa a ser supervalorizada pelo indivíduo em seu significado psicológico, emocional e comportamental (AGGARVAL et al., 2011; WILLIAMS et al., 2012).

Independente da sua classificação, quando a dor deixa de ser apenas um sinal de alerta e passa a ser uma doença, como acontece com as dores crônicas, ela interfere negativamente em vários aspectos da vida do indivíduo, o qual tem sua qualidade de vida significativamente reduzida pela experiência de dor

(DAVIES E CURTIN, 2016). Parte desse problema é decorrente da baixa efetividade dos tratamentos disponíveis em modificar os diferentes fatores que contribuem para a manifestação da dor, uma vez que os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo desenvolvimento da mesma ainda não foram completamente elucidados.

Desta forma, este estudo pretende contribuir para o entendimento da fisiopatologia da dor originada na região facial mediada pelo nervo trigêmeo e, desta forma, identificar possíveis alvos para o controle farmacológico da mesma.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SISTEMA SENSORIAL TRIGEMINAL

A principal inervação sensorial das estruturas orofaciais é conferida pelo sistema trigeminal. Este sistema supervisiona o desempenho e a integridade dos tecidos que participam dos comportamentos orofaciais altamente integrativos, os quais são controlados pelos nervos cranianos e modulados pelo sistema nervoso autônomo e pelo sistema límbico (TER HORST et al., 1991). No entanto, os nervos facial, glossofaríngeo, vago e os nervos cervicais 2 e 3 também transmitem informações sensoriais da face e de regiões adjacentes (DE ROSSI et al., 2013).

O maior dos nervos cranianos é o nervo trigêmeo que é constituído por três ramos periféricos, o oftálmico (V1), o maxilar (V2) e o mandibular (V3). Estes ramos inervam principalmente a pele da face, as córneas, as mucosas nasal e oral, os dentes, a língua, os músculos mastigatórios e a dura-máter (SESSLE, 2000; 20006). Desta forma, as informações sensoriais provenientes dessas regiões são captadas por receptores distribuídos em fibras sensoriais periféricas dos ramos do trigêmeo, as quais são especializadas na detecção de estímulos proprioceptivos, de estímulos térmicos e mecânicos, assim como de estímulos nocivos (BASBAUM et al. 2009; CUELLAR et al., 2010).

As fibras sensoriais podem ser classificadas em A α /A β , A δ e C, com base em suas características morfológicas e de sensibilidade (para revisões ver SESSLE, 2000; LAZAROV, 2002). Estímulos táteis e proprioceptivos são detectados por fibras A α /A β , as quais são altamente mielinizadas, possuem grande calibre (> 10 μ m), baixo-limiar de ativação e alta velocidade de condução (de 30 a 100 m/s). As fibras A δ são fibras menos mielinizadas do que as fibras A α /A β , possuindo assim menor calibre (2-6 μ m) e velocidade de condução intermediária (12-30 m/s), um alto-limiar de ativação, sendo responsáveis pela detecção de estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Diferentemente, as fibras C não são mielinizadas e apresentam assim um calibre menor (0,4-1,2 μ m) e velocidade de condução mais lenta (0,5-2 m/s) do que as fibras A, possuem um

alto-limiar de ativação e são responsáveis pela detecção de estímulos nocivos (LAWSON, 1996; para revisão ver MILLAN, 1999).

As fibras sensoriais A e C são neurônios pseudo-unipolares que no sistema trigeminal possuem corpos celulares localizados no gânglio do trigêmeo, também chamado de gânglio de Gasser ou semilunar. A partir do gânglio trigeminal, os processos centrais destas células entram na porção lateral da ponte em uma região referida como zona de entrada da raiz trigeminal (*root enter zone*, REZ) (SHANKLAND, 2000).

Quando as fibras sensoriais deixam a REZ, no nível do tronco encefálico, elas mudam sua direção para atingir seus núcleos próprios no complexo sensorial trigeminal localizado no tronco encefálico (para revisão ver DaSILVA e DosSANTOS, 2012). Nesse sentido, grande parte das fibras A deixam a porção rostral da REZ para atingir o núcleo sensorial principal na altura da ponte (fibras A α /A β) ou os subnúcleos *oralis* (fibras A α /A β) e *interpolaris* (fibras A δ). Por outro lado, uma menor proporção de fibras do tipo A δ , mas a maioria das fibras C segue para o subnúcleo *caudalis* terminando nas lâminas mais superficiais deste (DALLEL et al., 1998; 2003; SESSLE, 2000; SVENSSON e SESSLE, 2004; WODA et al., 2001; WODA, 2003). O subnúcleo *caudalis* está localizado na porção mais inferior do núcleo sensorial espinal do trigêmeo e faz conexão com o corno dorsal da medula espinal (para revisão ver SESSLE, 2000; DaSILVA e DosSANTOS, 2012; TAKEMURA et al., 2006).

As informações nociceptivas são processadas principalmente no subnúcleo *caudalis*, o qual apresenta uma estrutura laminar semelhante ao corno dorsal da medula espinal, sendo por isso chamado de corno dorsal bulbar. Tanto o o subnúcleo *caudalis* quanto o corno dorsal da medula espinal contem neurônios sensoriais de segunda ordem que recebem *inputs* das fibras aferentes primárias da região orofacial e de outras regiões do corpo, respectivamente (GOBEL, 1981; SESSLE, 2000). Esses neurônios de segunda ordem podem ser classificados como neurônios mecano-receptivos de baixo limiar, aqueles que respondem apenas a estímulos inócuos, como neurônios de ampla faixa dinâmica, aqueles que respondem tanto a estímulos inócuos quanto a estímulos nociceptivos, e como neurônios especificamente nociceptivos, os quais

respondem apenas a estímulos nocivos (para revisão ver REN E DUBNER, 2011).

Apesar das semelhanças com o sistema nociceptivo espinhal, foram identificadas algumas peculiaridades anatômicas e funcionais do sistema trigeminal (ERZURUMLU et al., 2010; para revisão ver Xie et al., 2016). Dentre estas diferenças está o fato de no núcleo sensorial trigeminal existir uma zona de transição entre o subnúcleo interpolaris e o subnúcleo caudalis (Vi/Vc), não encontrada no corno dorsal da medula espinhal (BEREITER et al., 2000; REN e DUBNER, 2011). Tem sido demonstrado que essa zona de transição Vi/Vc tem um papel importante no processamento de estímulos nociceptivos provenientes de tecidos profundos da região orofacial, como o músculo masseter, mas não no processamento de estímulos nociceptivos detectados na pele (WANG et al., 2006). Além disso, foi demonstrado, por exemplo, que os nociceptores trigeminais apresentam velocidade de condução de potenciais de ação mais lenta e limiares de temperatura mais baixos que os aferentes sensoriais espinhais (CUELLAR et al., 2010).

Uma vez que as informações nociceptivas chegam ao subnúcleo *caudalis*, estas são redirecionadas pelos neurônios de segunda ordem para os centros cerebrais superiores (para revisão ver XIE et al., 2016). Foi verificado que neurônios da porção ventral da zona de transição Vi/Vc se projetam, principalmente, para o núcleo submédio do tálamo (YOSHIDA et al., 1991), o qual está envolvido no processamento nociceptivo relacionado, particularmente, às respostas aversiva e afetiva (CRAIG e BURTON, 1981). Em adição, parte dos neurônios das regiões dorsal e ventral do Vi/Vc também se projeta para o núcleo parabraquial, o qual participa do processamento dos *inputs* nociceptivos trigeminais e da integração das respostas autonômicas e emocionais (FEIL e HERBERT, 1995; para revisão ver REN e DUBNER, 2011). No entanto, é no córtex cerebral, o qual recebe informações principalmente dos neurônios talâmicos de terceira ordem, que acontece o processamento dos aspectos cognitivos e afetivos da dor (para revisões ver JULIUS e BASBAUM, 2001; SESSLE 2006; TANG et al., 2009). Na figura 1 estão representadas as principais estruturas que compõem o sistema sensorial trigeminal.

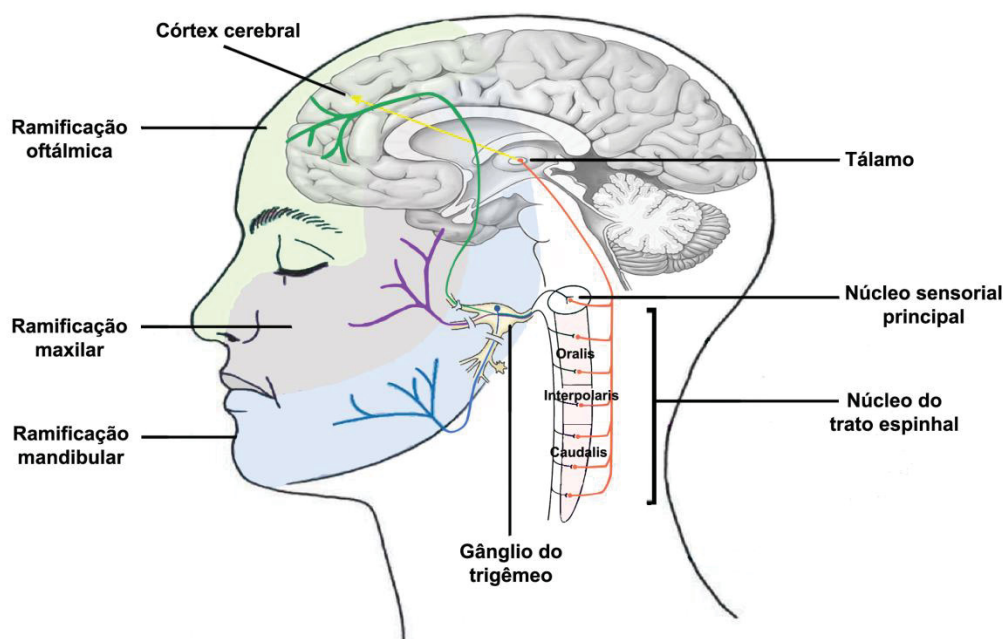


Figura 1. Representação do sistema sensorial trigeminal em humanos. Fonte: Kopruszinski (2015).

A qualidade da informação sensorial que chega ao córtex depende da modulação das vias envolvidas na transmissão dos estímulos nociceptivos pelas vias descendentes originadas no tronco encefálico. Regiões como substância cinzenta periaquedutal, núcleo magno da rafe e estruturas adjacentes ao bulbo rostral ventromedial (*rostral ventromedial medulla*, RVM) podem inibir ou facilitar a transmissão nociceptiva (CHEBBI et al., 2014; para revisões ver MALCANGIO e BOWERY, 1996; JULIUS e BASBAUM, 2001; SATO et al., 2013). Especificamente em relação ao RVM, essa estrutura faz conexão com a região Vc (OSSIPOVI, 2012), assim como faz e recebe conexões da parte ventral da zona de transição Vi/Vc do sistema trigeminal (CHAI et al., 2012; SUGYO et al., 2005).

Diferenças na modulação da transmissão nociceptiva pelo RVM também foram observadas entre os sistemas trigeminal e espinhal. Nesse sentido, foi demonstrado que, num modelo de enxaqueca induzida pela inflamação da dura-máter, o bloqueio do RVM com lidocaína foi capaz de reverter a alodinia mecânica observada na região frontal da face, mas apenas atenuou a alodinia mecânica observada na pata dos animais (EDELMAYER et al., 2009). Em adição, Aicher et al. (2012) demonstrou que as projeções do RVM para a região Vc do sistema

trigeminal possuem uma menor proporção de neurônios gabaérgicos em relação às conexões com o corno dorsal da medula espinhal.

Considerando as diferenças anatômicas e funcionais entre os sistemas nociceptivo trigeminal e espinhal, extrapolações de mecanismos fisiopatológicos e de alvos farmacológicos entre os dois sistemas torna-se inviável.

2.2 DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL

Estudos demográficos mostram que mais de 39 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América reportam dor na região orofacial. Índices semelhantes de prevalência foram observados no Reino Unido e na Alemanha (HARGREAVES, 2011).

Dor orofacial se refere à dor associada aos tecidos da cabeça, face e pescoço, que podem ser originadas de estruturas da polpa e periodontal, vascular, glândulas, músculos, osso, sinus e articulação (para revisão ver DE ROSSI et al., 2013). O aparecimento de dores orofaciais pode estar relacionado a doenças em qualquer das estruturas orofaciais mencionadas acima, a anormalidades psicológicas ou ainda ser desencadeada por outras fontes, como alterações na musculatura cervical e doenças intracranianas. Além disso, as dores orofaciais podem ocorrer na ausência de anormalidades físicas, laboratoriais ou de imagem passíveis de identificação, o que dificulta consideravelmente seu manejo clínico (STOHLER, 2001).

Dores orofaciais associadas a condições físicas incluem as disfunções temporomandibulares, como aquelas que afetam a articulação temporomandibular ou as estruturas músculo-esqueléticas, as dores neuropáticas, como a neuralgia do trigêmeo e a neuralgia glossofaríngea, e as desordens neurovasculares, tais como a enxaqueca. Quando são decorrentes de condições psicológicas, geralmente as dores orofaciais estão associadas a distúrbios de humor e ansiedade. (ROMERO-REYES e UYANIK, 2014).

As dores neuropáticas orofaciais têm uma incidência estimada de 5 a 10 casos para cada 100 mil pessoas (KITTEL et al., 2000; LIPTON et al., 1993; MARBACH, 1999). Estas são classificadas em desordens episódicas, como a neuralgia do trigêmeo e a neuralgia glossofaríngea, e em desordens de dor

contínua, as quais geralmente resultam de perda de fibras nervosas aferentes após lesão do sistema nervoso periférico ou central, e incluem as dores neuropáticas trigeminais atípicas como a odontalgia atípica (para revisão ver ROMERO-REYES e UYANIK, 2014).

As dores neuropáticas geralmente resultam da lesão ou disfunção de estruturas centrais ou periféricas do sistema nervoso e se caracterizam por dor espontânea, com características de queimação, choque, pontada, pela dor provocada por estímulos normalmente inócuos, a alodinia, ou ainda por uma sensibilidade exacerbada a estímulos nocivos, a hiperalgesia (para revisão ver FINNERUP et al., 2007; WANG et al., 2012).

A neuralgia do trigêmeo é a forma mais comum de dor neuropática orofacial e sua incidência global está estimada em cerca de 4 a 28,9 a cada 100 mil indivíduos (HALL et al., 2008; KATUSIC et al., 1991; KOOPMAN et al., 2009). A incidência é maior em mulheres (proporção 2:1), geralmente com idade entre 40 e 60 anos, embora possa ter início na terceira década (CHILDS et al., 2000).

A neuralgia do trigêmeo é descrita como uma desordem unilateral, caracterizada por episódios paroxísticos de dor, de início e término rápidos, limitada à distribuição de uma ou mais divisões do nervo trigêmeo, que pode ser desencadeada por estímulos inócuos e se desenvolver sem causa aparente, ou ser resultado de outra desordem diagnosticada. Alguns indivíduos diagnosticados com neuralgia do trigêmeo também podem apresentar dor de forma contínua e de intensidade moderada (HEADACHE CLASSIFICATION SUBCOMMITTEE OF THE INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2013). Os ataques de dor podem durar de alguns segundos a vários minutos, e são seguidos de intervalos sem dor. Eles podem ocorrer diariamente, numa frequência de 4 ou 5 até centenas por dia, podendo durar de semanas a meses e ter um período de meses ou anos de remissão da dor. A dor é severa e intensa, e é descrita como cortante ou algo que lembra um esfaqueamento ou tiro. Algumas pessoas podem apresentar também dor contínua de menor intensidade em 50% do tempo (ZARKZEWSKA e LINSKEY, 2015).

Fatores que podem desencadear os episódios de dor incluem comer, falar, lavar o rosto, escovar os dentes, se expor ao vento ou mesmo um leve toque em qualquer área inervada pelo nervo trigêmeo (EL-TALLAWY, 2013;

THOMAS e VILENSKY, 2013). Desta forma, a neuralgia do trigêmeo pode prejudicar as atividades do cotidiano e reduzir consideravelmente a qualidade de vida dos sujeitos acometidos por essa condição (KLEEF et al., 2009).

A etiologia da neuralgia do trigêmeo e os mecanismos subjacentes a esta condição ainda são pouco entendidos. A teoria mais aceita sobre sua causa refere-se à compressão vascular das raízes nervosas do trigêmeo, as quais sofrem alterações em sua estrutura ou regiões adjacentes (JANNETTA, 1980; KERR, 1967; HAMLYN e KING, 1992). Dentre as anormalidades identificadas na região da compressão estão a perda focal da mielina, a justaposição de axônios desmielinizados (HILTON et al., 1994; LOVE e COAKHAM, 2001) e a presença de grande número de fibras de colágeno na matriz extracelular (HILTON et al., 1994; LOVE e COAKHAM, 2001; RAPPAPORT et al., 1997). Além disso, em pacientes com neuralgia do trigêmeo foram descritas alterações centrais em estruturas associadas com o processamento e a percepção da dor, como o tálamo e o córtex somatossensorial, os quais apresentaram uma redução significativa no volume de substância cinzenta (OBERMANN et al., 2013).

O ramo maxilar do nervo trigêmeo é o único envolvido na maioria dos casos de neuralgia do trigêmeo e em cerca de 30% dos casos ocorre também o envolvimento do ramo mandibular. O envolvimento do ramo oftálmico ou casos de neuralgia do trigêmeo bilateral são raros (KLEEF et al., 2009; ZARKZEWSKA e LINSKEY, 2015). A alta proporção de fibras A β e A δ no ramo maxilar e o fato deste ramo se localizar em posições mais superiores da REZ o torna mais susceptível à compressão, principalmente pela artéria cerebelar superior (para revisão ver DaSILVA e DosSANTOS, 2012; SINDOU et al., 2002).

Para explicar os ataques paroxísticos de dor característicos da neuralgia do trigêmeo, considerando as alterações identificadas no local da compressão da raiz nervosa, foi sugerida a hipótese da ignição. Essa hipótese propõe que os neurônios sensoriais parcialmente danificados se tornam hiperexcitáveis e passam a recrutar neurônios vizinhos, levando a um rápido acúmulo de atividade elétrica, a qual pode ser amplificada uma vez que a bainha de mielina está danificada e as fibras nervosas seguem num contato próximo umas das outras, devido à compressão das fibras. Desta forma, a estimulação de uma única fibra sensorial pode levar à ativação de várias outras e as explosões de atividade

neuronal desencadeadas por um único estímulo externo podem se estender além da duração do estímulo. Em adição, este fenômeno sincronizado seria cessado por uma hiperpolarização decorrente do influxo de íons potássio, o que poderia justificar, pelo menos em parte, o período refratário subsequente à crise (DEVOR et al., 2002a; 2002b; RAPPAPORT e DEVOR, 1994; ZARKZEWSKA e McMILLAN, 2011).

A hipótese da ignição explica parte dos mecanismos envolvidos em uma das principais características da neuralgia do trigêmeo, os ataques paroxísticos de dor. No entanto, a hiperalgesia e a alodinia relatadas por alguns pacientes, bem como a dor facial persistente ao fundo, que é característica de uma das formas de neuralgia do trigêmeo, possivelmente decorrem de outras alterações fisiopatológicas, assim como os outros sintomas.

Nesse sentido, tem sido sugerido que nas áreas de desmielinização ocorre um aumento na expressão de canais de sódio voltagem-dependente (Nav), os quais seriam responsáveis pela maior excitabilidade neuronal, justificando em parte o desenvolvimento da hiperalgesia, assim como pelos disparos ectópicos das fibras aferentes trigeminais. Corroborando essa hipótese, em amostras de tecido gengival de pacientes com neuralgia do trigêmeo foi detectada um nível maior de expressão de canais de sódio do tipo Nav1.3 em relação ao grupo controle (SIQUEIRA et al., 2009). Ainda, considerando que fármacos bloqueadores de canais de sódio, como a carbamazepina, são eficazes no controle da dor em pacientes com neuralgia do trigêmeo, é possível que os canais de sódio tenham um papel relevante na fisiopatologia desta condição.

O tratamento farmacológico é a primeira escolha para o controle da neuralgia do trigêmeo e é iniciado com fármacos anticonvulsivantes, sendo a primeira escolha a carbamazepina. No entanto, quando o perfil de risco e benefício do tratamento se torna desfavorável para o indivíduo, outras classes farmacológicas passam a ser utilizadas, tais como os antidepressivos, embora não existam evidências suficientes para recomendar sua utilização (para revisão ver AI-QULITI, 2015; HALPERN e WILLIS, 2016).

Além disso, os tratamentos farmacológicos recomendados (HALPERN e WILLIS, 2016), ou as intervenções cirúrgicas disponíveis (PETIT et al., 2003; PARK et al., 2011), não proporcionam um alívio considerável da dor, justificando a

importância de novos estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da neuralgia do trigêmeo.

Em 1991, Vos e Maciewicz desenvolveram um modelo animal para o estudo das dores neuropáticas de origem trigeminal, como a neuralgia do trigêmeo, o qual consiste na constrição do nervo infraorbital de ratos. A face desses animais é inervada de forma semelhante à face de humanos pelas ramificações oftálmica, maxilar e mandibular do nervo trigêmeo. O nervo infraorbital integra o ramo maxilar e é responsável pela inervação da região das vibrissas, lábio superior, dentes, mucosa maxilar superior e da pele na região da órbita (BENOLIEL *et al.*, 2001). Este nervo é predominantemente sensorial e é formado por 18 a 25 feixes nervosos, os quais contêm aproximadamente 60% de fibras mielinizadas e 40% não mielinizadas (JACQUIN *et al.*, 1990). Suas fibras se projetam para os subnúcleos trigeminais *caudalis* e *interpolaris*, porém o subnúcleo *caudalis* parece ter uma maior relevância no processamento nociceptivo pelo fato de receber um maior número de fibras C (para revisão ver SESSLE, 2006).

O modelo de constrição do nervo infraorbital em ratos, o qual foi utilizado nesse estudo, promove o desenvolvimento de dor espontânea e hiperalgesia a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conforme esquematizado na figura 2 (VOS *et al.*, 1994; IMAMURA *et al.*, 1997; ANDERSON *et al.*, 2003; CHICHORRO *et al.*, 2006a; 2006b; 2009), mimetizando parte dos sintomas apresentados por indivíduos com neuralgia do trigêmeo.

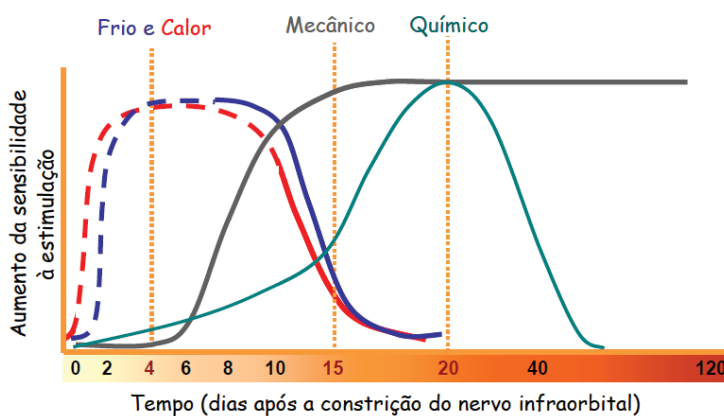


Fig. 2. Decurso temporal da hipernocicepção orofacial a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, induzida pela constrição do nervo infraorbital de ratos. Fonte: Chichorro (2006).

Assim como observado no estudo clínico de Siqueira et al. (2009), a hiperalgesia térmica e mecânica observada nos animais submetidos à contração do nervo infraorbital parecem estar relacionadas a um aumento da expressão de canais de sódio Nav1.9 (LUIZ et al., 2015). Resultados semelhantes foram obtidos por Davies et al. (2006) após a lesão do nervo alveolar inferior, um dos feixes do ramo mandibular do nervo trigêmeo. Nesse estudo, foi observado um acúmulo de canais de sódio Nav1.8 e Nav1.9 no local da lesão, e que coincidiu com o período em que foi reportada a atividade ectópica máxima do nervo.

Outros canais iônicos, como os receptores de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) também parecem contribuir para as alterações sensoriais observadas após lesão do nervo trigêmeo (CRUZ et al., 2014; URANO et al., 2012). O receptor TRPV1 é um canal catiônico não seletivo, com alta permeabilidade para o cálcio, o qual é ativado por uma variedade de agentes, incluindo capsaicina, prótons, calor nocivo (acima de 43°C), entre outros. Em condições fisiológicas esses receptores são expressos principalmente em fibras C peptidérgicas e sua participação no desenvolvimento de hiperalgesia associada a processos inflamatórios é bem estabelecida (GAVVA *et al.*, 2005; VAY *et al.*, 2012; JULIUS, 2013). No estudo de Urano et al. (2012) foi observado um aumento da expressão dos receptores TRPV1 nos gânglios trigeminais de ratos submetidos à contração do nervo infraorbital, porém, em fibras mielinizadas de grande diâmetro. Em adição, esses autores verificaram que a hiperalgesia térmica ao calor observada após a contração do nervo é mediada, pelo menos em parte, por estes receptores, corroborando os dados de Cruz et al. (2014), no qual foi demonstrado que a deleção de fibras que expressam TRPV1 previne o desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor induzida pela contração do nervo infraorbital.

Os dados mencionados acima não refletem todas as alterações envolvidas no desenvolvimento da dor neuropática trigeminal, apenas complementam os dados observados nos estudos clínicos. Porém, esses estudos deixam clara a complexidade dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da dor neuropática trigeminal. Desta forma, com o intuito de contribuir para o entendimento desta condição, esse estudo propõe investigar a participação dos

fatores neurotróficos, fator de crescimento do nervo e neurotrofina-3, no processamento de informações nociceptivas na região facial.

2.3 FATORES NEUOTRÓFICOS

Os fatores neurotróficos, ou neurotrofinas, constituem uma família de proteínas relacionadas que inclui o fator de crescimento do nervo (NGF), o fator neurotrófico do cérebro (BDNF), a neurotrofina-(NT)-3, a NT-4/5 e a NT-6 (para revisão ver PEZET e McMAHON, 2006; SINISCALCO et al., 2011).

As neurotrofinas são sintetizadas como proteínas precursoras, as pro-neurotrofinas (pro-NTs) de 30 a 34 kDa, que são clivadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi por convertases para dar origem às proteínas C-terminal maduras, que possuem 13 a 15 kDa de tamanho. Tanto as pro-NTs quanto as proteínas finais são liberadas na forma de homodímeros não covalentes estáveis, mas parecem possuir propriedades sinalizadoras diferentes (REICHARDT, 2006; TENG et al., 2010). A síntese das neurotrofinas ocorre principalmente nos corpos celulares dos neurônios sensoriais, e podem ser retrogradamente transportadas para a medula espinhal (para revisão ver KELLEHER et al., 2016)

Os efeitos biológicos das proteínas maduras são mediados por receptores Trk (*tropomyosine* ou *tyrosine receptor kinase*) e receptores p75 (*pan neurotrophine receptor at 75 kDa*, *p75NR*). Cada neurotrofina se liga a um receptor Trk específico e todas se ligam ao receptor comum p75 com menor afinidade. O NGF se liga com alta afinidade ao receptor TrkA, o BDNF e a NT-4/5 ao receptor TrkB e a NT-3 ao receptor TrkC (PATAPOUTIAN e REICHARDT, 2001).

Com relação às pro-NTs, estas se ligam com alta afinidade aos receptores p75 e ao co-receptor sortilina (NYKJAER e WILLNOW, 2012). No entanto, alguns estudos mostram que as proteínas pro-NGF e pro-BDNF podem se ligar aos receptores TrkA e TrkB, respectivamente, embora com menor afinidade do que ao receptor p75 (FAYARD et al., 2005; MASOUDI et al., 2009).

Durante o desenvolvimento neuronal, as neurotrofinas dão suporte ao crescimento e sobrevivência de diferentes subpopulações neuronais, as quais expressam receptores específicos (para revisão ver PEZET e McMAHON, 2006;

SINISCALCO et al., 2011). Nesse sentido, tem sido demonstrado que a ligação das neurotrofinas aos seus respectivos receptores Trk promove diferenciação e sobrevivência das células neuronais. Especificamente com relação às ações da NT-3, apesar da alta afinidade desta neurotrofina pelo receptor TrkC, alguns estudos demonstraram que suas ações podem ser mediadas pela sua ligação aos receptores TrkA e TrkB. No estudo de Ridén e Ibáñez (1996), os autores observaram que a ligação da NT-3 a receptores p75, TrkA e TrkB depende de uma região estrutural comum da NT-3 e que esta é diferente da região responsável pela ligação desta neurotrofina ao receptor TrkC (BENEDETTI et al., 1993; CLARY E REICHARDT, 1994; RIDÉN E IBÁÑEZ, 1996). Nesse contexto, durante o período de desenvolvimento dos gânglios trigeminais de camundongos, Huang et al. (1999) observaram que a sobrevivência dos neurônios trigeminais depende do suporte da NT-3 mediado tanto pelo receptor TrkC quanto pelos receptores TrkA e TrkB.

A ligação de cada neurotrofina ao seu receptor Trk promove dimerização e autofosforilação, o que resulta na ativação do receptor e no início de complexas cascatas bioquímicas que culminam na resposta celular (SCARPI et al., 2012). As vias de sinalização intracelulares que medeiam os efeitos das neurotrofinas incluem a via da proteína quinase reguladora de sinal extracelular (ERK), fosfatidilinositol quinase-3 (PI3K), fosfolipase C- γ (PLC- γ 1) e quinase RhoA (CHAO, 2003; REICHARDT, 2006).

A ligação das neurotrofinas aos receptores p75 também pode promover sobrevivência via fator nuclear de transcrição kappa-B (NF- κ B) ou afetar a organização do citoesqueleto e o crescimento de neurites através da proteína quinase RhoA (CHAO, 2003; REICHARDT, 2006). Em adição, a ativação dos receptores p75 pelas neurotrofinas pode promover morte celular pela sinalização intracelular mediada pela quinase c-Jun N-terminal (JNK) e na sequência pela p53, induzindo a apoptose celular (CHAO, 2003; REICHARDT, 2006). Além disso, foi demonstrado que os receptores TrkA e TrkC, mas não o TrkB, induzem morte celular de neurônios em desenvolvimento quando as neurotrofinas ligantes correspondentes não estão disponíveis. Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda estão em investigação, mas parecem não depender da autofosforilação dos receptores TrkA e TrkC e sim decorrer de processos

intracelulares mediados, pelo menos em parte, pelos receptores p75. (NIKOLETOPOULOU et al., 2010)

Em animais adultos, aproximadamente 40-50% dos neurônios sensoriais primários expressam o receptor TrkA, seletivo para o NGF; 20-30% expressam o receptor TrkB para o BDNF; e 20-30% dos neurônios expressam o receptor TrkC, seletivo para a NT-3 (PAN et al., 2000; SCARPI et al., 2012).

A expressão de TrkA é predominante em neurônios que expressam CGRP e têm predominantemente axônios não-mielinizados ou pouco mielinizados (SILOS-SANTIAGO et al., 1995), enquanto que TrkC é expresso quase exclusivamente em neurônios de grande diâmetro do gânglio da raiz dorsal, sugerindo que as populações dependentes de NGF e NT-3 são funcionalmente distintas (MCMAHON et al., 1994; MU et al., 1993).

O estudo de Crowley et al. (1994) mostrou que a maioria dos neurônios que expressam TrkA transmitem informações nociceptivas. Em contraste, neurônios que expressam TrkC possuem axônios calibrosos e mielinizados (MU et al., 1993, COPRAY e BROUWER, 1994, ERNFORS et al., 1994; KLEIN et al., 1994; MCMAHON et al., 1994) e estão principalmente envolvidos na transmissão da informação proprioceptiva ou mecânica de baixo limiar (ERNFORS et al., 1994; FARINAS et al., 1994; KLEIN et al., 1994; AIRAKSINEN et al., 1996). Estudos no gânglio da raiz dorsal de ratos adultos indicam que, apesar de TrkA e TrkC serem expressos em populações neuronais distintas, TrkB pode ser co-expresso com TrkA ou TrkC (MCMAHON et al., 1994; WRIGHT e SNIDER, 1995; PHILLIPS e ARMANINI, 1996).

Especificamente em relação ao sistema sensorial trigeminal, Jacobs e Miller (1999) evidenciaram a expressão dos receptores TrkA, TrkB, TrkC e p75 em estruturas do sistema trigeminal de ratos adultos, como nos gânglios trigeminais e nos núcleos mesencefálico, sensorial principal e motor trigeminal. Dados semelhantes foram obtidos por Genç et al. (2005), os quais mostraram um padrão de expressão dos receptores Trk nos gânglios trigeminais semelhante ao observado em gânglios da raiz dorsal, ou seja, receptores TrkA expressos principalmente em fibras de pequeno diâmetro e TrkB e TrkC em fibras de grande diâmetro, em gânglios coletados na fase embrionária.

O papel dos fatores neurotróficos na sobrevivência, diferenciação e manutenção dos neurônios sensoriais já é bem estabelecido, apesar da complexidade das vias endógenas de sinalização que medeiam seus efeitos. No entanto, a capacidade destes fatores neurotróficos de modular as fibras do sistema nervoso central e periférico já desenvolvidas ainda requer investigação. Nesse contexto, tem sido proposto um papel principal para as neurotrofinas na modulação do processamento de estímulos nociceptivos, considerando que seus receptores são amplamente expressos em fibras sensoriais. Desta forma, este estudo pretende avaliar a participação do NGF e da NT-3 nas respostas nociceptivas desencadeadas pela estimulação da região facial de ratos.

2.3.1 Evidências da participação do NGF e da NT-3 na nocicepção

O NGF foi o primeiro fator neurotrófico descoberto em 1948 por Elmer Bueker, confirmado por Rita Levi-Montalcini (COHEN et al., 1954; LEVI-MONTALCINI, 1987) e então isolado em 1960 por Stanley Cohen a partir de glândula submandibular de camundongo (COHEN, 1960).

No sistema nervoso central, o NGF é produzido principalmente por astrócitos e armazenado na matriz celular. Porém, durante um processo inflamatório, oligodendrócitos e células da zona subventricular podem produzir NGF e expressar seus receptores, o que parece estar relacionado a um mecanismo de reparo e proteção do tecido neuronal. (para revisão ver COLAFRANCESCO e VILLOSLADA, 2011)

Periféricamente, o NGF pode ser produzido, armazenado e liberado por diversos tipos celulares, como mastócitos, eosinófilos, linfócitos, macrófagos, assim como por células de Schwann após lesão neuronal, e por queratinócitos na pele (para revisão ver XIAN e ZHOU, 2009; HOLMES, 2012; KHAN e SMITH, 2015).

Vários estudos têm demonstrado um papel pró-nociceptivo para o NGF. Em humanos, a administração de NGF na pele induz sensibilidade a estímulos mecânicos e intensa hiperalgesia a estímulos térmicos, a qual foi observada 3 horas após sua administração (DYCK et al., 1997). Dados semelhantes foram obtidos por Rukwied et al. (2010), que observaram o desenvolvimento de

hiperalgesia térmica ao calor, ao frio e mecânica, em diferentes tempos após a aplicação do NGF. Também no estudo de Svensson et al. (2003), a administração de NGF no músculo masseter resultou em sinais característicos de hiperalgesia e alodinia mecânica.

Em roedores, a administração local ou sistêmica de NGF induz hiperalgesia térmica aguda e hiperalgesia mecânica tardia. A hiperalgesia térmica induzida pelo NGF envolve a sensibilização de nociceptores periféricos e sua manutenção parece ser mediada centralmente. Com relação à hiperalgesia mecânica, tem sido demonstrado que seu desenvolvimento e manutenção são mediados por mecanismos periféricos e centrais diferentes dos envolvidos na hiperalgesia térmica induzida pelo NGF, embora os mesmos ainda não tenham sido completamente elucidados. (LEWIN e RITTER, 1993; LEWIN et al., 1994; MA e WOOLF, 1997; RUKWIED et al., 2010) Em nível central, o estudo de Panfil et al. (2006) demonstrou que a injeção de NGF nos músculos do pescoço de camundongos é capaz de evocar ativação neuronal em áreas da medula espinhal e do tronco encefálico que estão envolvidas no processamento de estímulos nociceptivos.

Parte dos mecanismos envolvidos na hiperalgesia induzida pela administração de NGF envolve um aumento da expressão ou da disponibilidade de neuropeptídeos, de receptores para outras substâncias algogênicas e de canais iônicos em neurônios sensoriais (ALOE et al, 2012; KHAN e SMITH, 2015). Nesse contexto, foi observado *in vitro* que o NGF é capaz de aumentar a liberação de substância P pela medula espinhal (MALCANGIO et al., 1997; 2000), assim como do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (DONNERER et al., 1992) e do BDNF por aferentes primários (MICHAEL et al., 1997), e também a expressão de receptores de bradicinina (via p75) em células do gânglio da raiz dorsal (DRG) (PERTERSEN et al., 1998). Os receptores de bradicinina do tipo 1 (BK1) medeiam parte da hiperalgesia térmica induzida pelo NGF (RUEFF et al., 1996).

Além disso, foi observado que o NGF é capaz de promover um aumento nos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de receptores TRPV1 em cultura de neurônios do DRG (WINSTON et al., 2001). Posteriormente, verificou-se que a ligação de NGF ao seu receptor TrkA desencadeia cascatas

intracelulares que culminam na ativação da proteína quinase C (PKC) e na liberação de íons cálcio de depósitos intracelulares, levando à sensibilização de neurônios sensoriais (CHAO, 2003). Complementando os dados acima, Shu e Mendell (1999; 2001) demonstraram através de experimentos de eletrofisiologia em neurônios do gânglio da raiz dorsal que a exposição dessas células ao NGF promove um aumento nas correntes induzidas por capsaicina (agonista TRPV1), previne a taquifilaxia observada após a segunda aplicação da mesma, e evidenciaram que estes efeitos são mediados por receptores TrK, através da via de sinalização da proteína quinase A (PKA). Posteriormente, Zhang et al. (2005) demonstraram que a ativação dos receptores TrkA pelo NGF ativa a via de sinalização da PI3K, culminando na fosforilação dos receptores de potencial transitório vanilóide-1 (TRPV1) e na translocação destes receptores para a membrana, o que também poderia explicar os efeitos de sensibilização rápida dos neurônios sensoriais pelo NGF e seus efeitos hiperalgésicos em alguns protocolos. Dados semelhantes foram obtidos por Stein et al. (2006), os quais demonstraram um aumento no número de receptores TRPV1 na membrana de neurônios do gânglio da raiz dorsal dissociados em cultura após exposição ao NGF e a efetividade de um inibidor seletivo da PI3K em abolir a sensibilização dos neurônios mediada pelo NGF, sugerindo a importância da PI3K e dos receptores TRPV1 nos efeitos nociceptivos deste fator neurotrófico.

Os receptores p75 podem mediar diretamente a hiperalgesia mecânica induzida pelo NGF (KHODOROVA et al., 2013), porém sua contribuição para o desenvolvimento da hiperalgesia térmica parecer ser apenas como modulador dessa resposta, sendo os receptores TrkA os principais mediadores da hiperalgesia térmica induzida pelo NGF (KHODORA et al., 2017). Tem sido demonstrado que os neutrófilos e, principalmente, os mastócitos também contribuem para a hiperalgesia induzida pelo NGF. No estudo de Bennett et al. (1998) foi verificado que a administração intraplantar de NGF promove um acúmulo de neutrófilos no local da injeção e que a depleção dessas células abole o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor. Com relação à participação dos mastócitos na hiperalgesia induzida pelo NGF, foi observado que a administração de composto 48/80, um indutor da degranulação de mastócitos, é capaz de reduzir a hiperalgesia térmica induzida pela administração intraplantar de NGF em

ratos (AMANN et al., 1995). Corroborando esses dados, foi demonstrado num modelo de lesão do nervo ciático que tanto a administração de um antisoro anti-NGF quanto do composto 48/80 são capazes de prevenir o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica (THEODOSIOU et al., 1999; para revisão ver MENDELL et al., 1999).

Por outro lado, o bloqueio do NGF pela administração sistêmica de anticorpos anti-NGF reduz a sensibilidade aos estímulos térmico e mecânico, previne o aumento nos níveis de neuropeptídeos e a expressão do gene *c-fos* em neurônios nociceptivos do corno dorsal de ratos, num modelo de inflamação por adjuvante completo de Freund (CFA) (WOOLF et al., 1994). Corroborando esses dados, Gould et al. (2000) demonstraram que a administração de antisoro anti-NGF foi capaz de prevenir o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela aplicação de NGF na pata de ratos, além de prevenir o aumento da expressão de canais de sódio no gânglio da raiz dorsal. Ainda, o estudo de Deng et al. (2000) mostrou que a administração intraperitoneal e no DRG de anti-NGF em ratos reverte o crescimento de fibras simpáticas no DRG, o que normalmente ocorre após a ligação do quinto nervo espinhal lombar, reduzindo a alodinia mecânica associada a esse processo. De forma semelhante, o bloqueio local ou sistêmico de NGF pelo anticorpo IgG anti-TrkA inibe a sensibilização dos neurônios sensoriais por mediadores inflamatórios, reverte a resposta hiperalgésica provocada pela administração de NGF (XIAN e ZHOU, 2009; HEFTI et al., 2006), e reduz a resposta nociceptiva no teste de formalina em camundongos (UGOLINI et al., 2007; para revisão ver KHAN e SMITH, 2015).

Especificamente em relação a estruturas envolvidas no processamento nociceptivo trigeminal, Sullins et al. (2000) observaram um aumento da expressão de TrkA nos gânglios trigeminais de ratos submetidos à lesão da polpa dentária, que se manteve elevada até 7 dias após a lesão, voltando a valores basais 14 dias após a indução da mesma. Em adição, Shinoda et al. (2011) verificaram que a administração de NGF no lábio inferior de camundongos induz hiperalgesia ao calor, e que a administração diária de anticorpo anti-NGF no lábio inferior ou intraganglionar de um inibidor de Trk (K-252a) é capaz de reduzir a hiperalgesia térmica induzida por CFA. Além disso, no estudo de Diogenes et al. (2007) foi demonstrado que o NGF aumenta a expressão do RNAm para TRPA1 em

neurônios do gânglio trigeminal *in vitro* e *in vivo* quando administrado sistemicamente ou diretamente nos gânglios trigeminais durante 7 dias. Esses mesmos autores também observaram que o NGF é capaz de aumentar as correntes induzidas por óleo de mostarda via TRPA1, demonstrando um aumento da atividade deste receptor (DIOGENES et al., 2007).

Apesar de grande parte dos estudos publicados relatarem o NGF como um agente hiperalgésico, existem dados que demonstram um papel anti-hiperalgésico para o mesmo. Cirillo et al. (2010) observaram que a administração intratecal de NGF durante 7 dias reduz a hiperalgesia térmica e mecânica de ratos submetidos à constrição do nervo ciático, corroborando dados semelhantes obtidos anteriormente por Ren et al. (1995).

Com relação à participação da neurotrofina-3 (NT-3) na modulação dos processos nociceptivos, vários estudos têm sugerido um papel anti-nociceptivo para a NT-3 em diferentes modelos de dor. Watanabe et al. (2000) observaram um efeito antinociceptivo da NT-3, no qual a injeção intraplantar desta neurotrofina foi capaz de reverter a hiperalgesia mecânica induzida por CFA, administrado na pata de ratos. No estudo de Wilson-Gerwing et al. (2005), a infusão intratecal de NT-3 (600 ng/μL/h) durante 7 dias, iniciada no momento da cirurgia de constrição do nervo ciático, atenuou o desenvolvimento da hiperalgesia térmica. A infusão de NT-3 do 7º ao 14º dia após a cirurgia também reverteu a hiperalgesia térmica. Porém, a infusão de NT-3, iniciada no dia da cirurgia até o 7º dia, seguida da suspensão da infusão resultou em um reestabelecimento rápido da hipersensibilidade térmica, o que sugere que a atenuação de hiperalgesia térmica mediada por NT-3 requer sua presença constante. Em contraste, a hiperalgesia mecânica não foi alterada pela infusão de NT-3, seja nos primeiros ou nos últimos sete dias. Posteriormente, os autores mostraram nesse mesmo modelo que a infusão intratecal de NT-3 diminuiu significativamente a expressão de receptores TRPV1, dos canais Na_v1.8 e Na_v1.9 no gânglio da raiz dorsal e da proteína quinase fosforilada p38 MAPK (WILSON-GERWING et al., 2008). Possivelmente essas ações contribuíram para o efeito anti-hiperalgésico da NT-3, que parece agir de forma antagônica ao NGF.

As vias de sinalização intracelulares desencadeadas pela ligação da NT-3 aos receptores TrkC ou TrkA e TrkB não são conhecidas até o momento. Porém

em modelos de dor neuropática, a ativação dos receptores TrkA pelo NGF e TrkB pelo BDNF, parecem desencadear três vias principais, a via da proteína pequena ligadora de GTP (RAS), a qual na sequência ativa a proteína quinase ativada por mitógeno/ERK quinase (MEK), a proteína ativada por mitógeno (MAPK), a ERK e a p38; a via da proteína PI3K que é seguida da ativação da quinase AKT (AKT) e da ERK; e a via da PLC- γ 1 que culmina na liberação de inositol trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG) e íon cálcio e na ativação da proteína quinase C (PKC). Por outro lado, as ações das neurotrofinas mediadas pela ligação aos receptores p75 ativam a via da proteína c-JUN/NF- κ B. (para revisão ver KHAN e SMITH, 2015).

Considerando que a via da p38 MAPK pode estar envolvida na regulação de receptores TRPV1 e que a NT-3 reduz a expressão desta proteína, é possível que a rápida reversão da hiperalgesia ao calor em diferentes modelos de dor seja mediada por uma redução da atividade dos receptores TRPV1 (WILSON-GERWING et al.; 2005; para revisão ver HUDMON et al., 2008).

No estudo de Siuciak et al. (1994), os autores mostraram que a administração de NT-3 no mesencéfalo (numa região próxima à PAG e ao núcleo dorsal da rafe) aumentou a latência para resposta no teste de *tail-flick*, ao 5º e 11º dia da infusão, e também o *turnover* de serotonina no local da administração no 14º dia de infusão contínua. Desta forma, os autores sugerem que o efeito anti-nociceptivo da NT-3 nesse modelo envolva a ativação de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal e mediano da rafe que se projetam para a medula espinhal.

Por outro lado, um papel pró-nociceptivo para a NT-3 foi demonstrado no estudo de White (2000), no qual a administração de um oligonucleotídeo antisense para NT-3 foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica em animais submetidos à ligação parcial do nervo ciático. Dados semelhantes foram obtidos por Zhou et al. (2000), no qual a infusão de NT-3 no DRG de animais lesionados desencadeou hipersensibilidade mecânica temporária.

Com base nos estudos descritos, é possível inferir a participação do NGF e da NT-3 no processamento nociceptivo, seja induzindo ou revertendo a hiperalgesia a diferentes estímulos. Considerando que a maioria dos estudos apresentados demonstra a participação do NGF e da NT-3 nos processos nociceptivos que envolvem os nervos espinhais, torna-se relevante estabelecer se

o NGF e a NT-3 também participam do processamento nociceptivo vinculado ao sistema sensorial trigeminal e, desta forma, contribuir para o entendimento da fisiopatologia das dores orofaciais.

3 HIPÓTESE DO ESTUDO

Os fatores neurotróficos NGF e NT-3 são capazes de modular localmente as alterações sensoriais desencadeadas pela exposição da região facial a estímulos térmico e mecânico, porém de forma antagônica, tendo o NGF um papel pró-nociceptivo e a NT-3 um papel antinociceptivo.

4 OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a influência dos fatores neurotróficos, fator de crescimento do nervo (NGF) e neurotrofina-3 (NT-3), no processamento nociceptivo facial, bem como sua contribuição para o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica em um modelo de dor neuropática trigeminal em ratos.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com relação à participação do fator de crescimento do nervo (NGF) no processamento nociceptivo na região facial foram avaliados os seguintes aspectos:

- Se a administração local de NGF induz hiperalgesia térmica ao calor na região facial de ratos naïve;
- Se os receptores Trk e TRPV1 locais medeiam a hiperalgesia térmica ao calor induzida na região facial pela administração local de NGF;
- Se os mastócitos locais contribuem para a hiperalgesia térmica ao calor induzida na região facial pela administração local de NGF;
- Se o NGF contribui para hiperalgesia térmica ao calor induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital;
- Os níveis de NGF nos ramos infraorbitais de ratos que desenvolveram hiperalgesia térmica ao calor após a constrição do nervo infraorbital;
- Se a administração local de NGF induz hiperalgesia térmica ao frio na região facial de ratos naïve;
- Se o NGF contribui para hiperalgesia térmica ao frio induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital;
- Se a administração local de NGF induz hiperalgesia mecânica na região facial de ratos naïve;
- Se o NGF contribui para hiperalgesia mecânica induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital.

Com relação à participação da neurotrofina-3 (NT-3) no processamento nociceptivo na região facial foram avaliados os seguintes aspectos:

- Se a administração local de NT-3 induz hiperalgesia térmica ao calor na região facial de ratos naïve;
- Se a administração local de NT-3 é capaz de reverter a hiperalgesia térmica ao calor induzida na região facial pela administração local de NGF e de capsaicina;
- Se a administração local de NT-3 é capaz de reduzir a hiperalgesia térmica ao calor induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital;
- Os níveis de NT-3 nos ramos infraorbitais de ratos que desenvolveram hiperalgesia térmica ao calor após a constrição do nervo infraorbital;
- Se os receptores Trk participam da hiperalgesia ao calor induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital;
- Se os receptores Trk locais medeiam o efeito anti-nociceptivo da NT-3 sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital;
- Se a associação de doses ineficazes de NT-3 e anti-NGF, testadas neste estudo, é capaz de reduzir a hiperalgesia térmica ao calor induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital;
- Se a administração local de NT-3 é capaz de reduzir a hiperalgesia térmica ao frio e a hiperalgesia mecânica induzidas na região facial pela constrição do nervo infraorbital.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DROGAS E DILUENTES

Na tabela a seguir estão descritas as substâncias que foram utilizadas nesse estudo.

Tabela 1. Lista de substâncias utilizadas

Descrição da substância	Procedência
Anticorpo anti-fator de crescimento do nervo- β de rato (anti-NGF)	R&D (Minneapolis, MN, USA)
BCTC [N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide] (antagonista de receptores TRPV1)	Santa Cruz (Dallas, TX, USA)
Capsaicina	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)
Cloridrato de cetamina 500 mg f/a	Rhobifarma Ind. Farmacêutica (Hortolândia, SP, Brazil)
Cloridrato de xilazina 2% f/a	Laboratórios König S.A. (Avellaneda, Argentina)
Composto 48/80	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)
Fator de crescimento do nervo- β (NGF)	R&D (Minneapolis, MN, USA)
K-252a (inibidor não-seletivo de receptores Trk)	Santa Cruz (Dallas, TX, USA)
Kit para dosagem do NGF: rat β -NGF DuoSet ELISA kit	R&D (Minneapolis, MN, USA)
Kit para dosagem da NT-3: Chemikine Neurotrophin 3 (NT-3) Sandwich ELISA Kit	MILLIPORE (Jeffrey, NH, USA)

Fonte: o Autor (2016).

Os fatores neurotróficos NGF e NT-3, o anti-NGF e o composto 48/80 foram dissolvidos em cloreto de sódio 0,9% (salina). O BCTC foi reconstituído em salina contendo 5% de tween 80 e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). O K-252a foi reconstituído em 100% de DMSO para a solução estoque e então diluído em salina para a concentração apropriada imediatamente antes da administração. A solução estoque de capsaicina foi preparada em salina contendo 10% de DMSO,

10% de tween 80 e 10% de etanol para diluição posterior em salina, imediatamente antes da administração. O cloridrato de cetamina e o cloridrato de xilaxina também foram diluídos em salina.

5.2 ANIMAIS

Em todos os experimentos foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, machos, pesando entre 180-230 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. No mínimo 3 dias antes dos experimentos, os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação e agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa. Os experimentos foram realizados em sala silenciosa com controle da temperatura e sempre durante a fase clara do ciclo. Todos os protocolos que foram utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFPR sob o número 734 (ver ANEXO 1), e seguiram a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) de 2016, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5.3 AVALIAÇÃO DA RESPONSIVIDADE FRENTE À ESTIMULAÇÃO DA REGIÃO FACIAL POR CALOR

Neste teste, os animais foram gentilmente contidos pela mão do experimentador com o auxílio de uma flanela e uma fonte de calor radiante ($\sim 50^\circ$) foi posicionada a aproximadamente 1 cm da área de inserção das vibrissas, ipsilateral à administração das drogas ou à cirurgia. Em seguida, foi registrado o tempo de latência para que os animais afastassem vigorosamente a cabeça da fonte ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas, conforme previamente descrito por Chichorro *et al.* (2009). Foram selecionados para os experimentos subsequentes os animais que apresentaram um tempo de

latência basal entre 8 e 15 s. Uma redução do tempo de latência em relação ao valor basal indica o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor.

5.4 AVALIAÇÃO DA RESPONSIVIDADE FRENTE À ESTIMULAÇÃO DA REGIÃO FACIAL POR FRIO

Para a realização deste teste os animais foram previamente habituados em caixas de observação por aproximadamente 30 min, e em seguida um spray de tetrafluoretano foi aplicado, por cerca de 1 s, na área de inserção das vibrissas, no lado ipsilateral à administração das drogas ou à cirurgia. Imediatamente após a aplicação, o tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (*grooming*) facial bilateral, com as patas dianteiras, foi registrado durante 2 minutos, conforme proposto por Chichorro *et al.* (2006a). Foram selecionados para os experimentos subsequentes os animais que apresentaram um tempo de *grooming* facial basal de até 15 s. Um aumento no tempo de *grooming* facial em relação ao valor basal indica o desenvolvimento de hiperalgesia ao frio.

5.5 AVALIAÇÃO DA RESPONSIVIDADE FRENTE À ESTIMULAÇÃO MECÂNICA DA REGIÃO FACIAL

Antes da aplicação dos estímulos mecânicos, os animais foram habituados por pelos menos 2 horas em caixas de observação. Quando não foram mais observados movimentos exploratórios, foi realizada uma pré-seleção dos animais a qual consistiu na aplicação crescente de 8 filamentos de Von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, USA, 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 g) na região de inserção das vibrissas. Cada filamento foi aplicado 3 vezes consecutivas, com um intervalo de ~3 s entre cada aplicação, ipsilateral à administração das drogas ou à cirurgia. Foi considerado o limiar de resposta dos animais à estimulação mecânica a força representada pelo filamento que evocou, por duas vezes, comportamentos como retirada rápida da cabeça e reações de ataque/escape (CHICHORRO *et al.*, 2006b). Apenas os animais que não apresentaram, na fase de pré-seleção, estes comportamentos nociceptivos com a

aplicação de todos os filamentos foram incluídos nos experimentos subsequentes, isto é, aqueles que possuíam um limiar de resposta à estimulação mecânica superior ou igual a 8 g. A redução do limiar mecânico em relação ao valor basal indica o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica.

5.6 REDUÇÃO DA RESPONSIVIDADE DE MASTÓCITOS

Para reduzir a responsividade dos mastócitos na região facial foi utilizado o CP48/80, que é um indutor da degranulação dessas células. Para induzir a degranulação dos mastócitos, o CP48/80 foi administrado diariamente em doses crescentes durante 4 dias (1, 3, 10 e 10 µg). No quinto dia, 24 horas após a administração da quarta dose do CP48/80, os animais foram ambientados em caixas de observação durante 15 minutos e na sequência foram tratados com o CP48/80, o qual foi administrado no lábio superior direito, por via subcutânea. Imediatamente após a administração, o tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (*grooming*) facial bilateral, com as patas dianteiras, foi registrado durante 30 minutos. Uma redução significativa da resposta nociceptiva induzida pelo CP48/80, ou seja, uma diminuição no tempo despendido pelos animais executando *grooming facial*, quando comparado aos animais do grupo controle tratados apenas com veículo durante os 4 dias anteriores, foi considerada um indicativo de que a degranulação de mastócitos foi eficaz em reduzir a responsividade dessas células (ANDRADE et al., 2008; PERIN-MARTINS et al., 2013).

5.7 CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

Para a indução da dor neuropática facial foi realizada a cirurgia de constrição do nervo infraorbital (CION) conforme o método proposto anteriormente por Vos et al. (1994), modificado por Chichorro et al. (2006a). Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina e de xilazina (60 e 7 mg/kg, respectivamente, via intraperitoneal) e foi realizada a assepsia da face com álcool iodado. Após o estabelecimento da anestesia, foi feita uma incisão na pele, abaixo do olho direito, cerca de 3 mm posterior à inserção das vibrissas. Os

músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior foram afastados para que a porção rostral do nervo infraorbital fosse exposta, próximo à fissura infraorbital. O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes e, em seguida, foram realizadas duas amarras frouxas, separadas aproximadamente 2 mm, com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso. Os tecidos foram suturados com o mesmo tipo de fio usado para a confecção das amarras. Os animais do grupo falso-operado (Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém o feixe nervoso não foi submetido à constrição. Ao término da cirurgia os animais foram mantidos em sala aquecida até sua completa recuperação da anestesia.

5.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE NGF E NT-3

Os níveis de NGF e NT-3 foram avaliados na porção periférica do nervo infraorbital, ipsi e contralateral à constrição do nervo (CION), quatro dias após a cirurgia. Antes da coleta das amostras, a latência para a resposta dos animais frente à estimulação da face por calor foi avaliada para confirmar o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor nos animais submetidos à CION. Na sequência os animais foram submetidos à eutanásia por overdose anestésica seguida de deslocamento cervical para a coleta do nervo infraorbital. Cada amostra foi constituída por dois nervos aleatórios. Os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador automático (Silverson, WT-130) com 200 µL de tampão de homogeneização a aproximadamente 4°C. Para a dosagem dos níveis de NGF foi utilizado o tampão de homogeneização descrito por Shinoda et al. (2009). Para a dosagem da NT-3 foi utilizado o tampão recomendado pelo fabricante do kit utilizado. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 15.000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C para separação do sobrenadante, o qual foi utilizado na análise. A quantificação dos níveis de NGF e de NT-3 foi realizada através do ensaio enzimático de imuno-reatividade (ELISA), por meio de kits específicos (R&D, DY556 para o NGF e MILLIPORE, CYT302 para a NT-3), de acordo com as instruções do fabricante. Dessa maneira, uma curva padrão foi gerada utilizando os valores das diluições em série dos padrões de NGF e NT-3, a qual foi utilizada para determinar as concentrações de NGF e

NT-3 nas amostras. As análises foram realizadas em duplicata e o valor de cada amostra foi normalizado pelo teor de proteína total, determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

5.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Grupos diferentes de animais foram utilizados em cada experimento. Os animais foram divididos aleatoriamente entre os grupos de tratamento descritos abaixo. Todas as drogas e veículos foram administrados no lábio superior direito, por via subcutânea (s.c), num volume de 50 µL. O experimentador responsável por testar os animais era cego ao tratamento e/ou à condição do animal.

Para avaliar o papel do NGF no processamento nociceptivo em ratos naïve, a resposta basal frente à estimulação da região facial por calor, frio ou frente à estimulação mecânica foi avaliada antes de qualquer tratamento e a cada 1 hora, durante 6 horas, após a administração de NGF. Os animais dos grupos controles foram tratados com os respectivos veículos das drogas testadas. As doses de NGF foram baseadas em estudos anteriores (RO et al, 1999; PELEGRINI-DA-SILVA et al, 2008). Os protocolos utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Protocolos experimentais utilizados para avaliar o papel do NGF no processamento nociceptivo em ratos naïve

Objetivos específicos	Protocolos experimentais utilizados para atingir os objetivos
Avaliar se a administração de NGF induz hiperalgesia ao calor, ao frio e mecânica.	O NGF foi administrado nas doses de 1 e 3 µg. A resposta dos animais frente à estimulação mecânica da face também foi avaliada 24 horas após a administração do NGF.
Avaliar o efeito da administração do anti-NGF na hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF.	O anti-NGF foi administrado na dose de 3 µg, 1 hora antes da administração do NGF (3 µg). As doses de anti-NGF foram baseadas em estudos anteriores (RO et al, 1999; PELEGRINI-DA-SILVA et al, 2008).
Avaliar se os receptores TrkA e TRPV1 contribuem para a hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF.	O inibidor não-seletivo de receptores Trk, K-252a (1 µg), e o antagonista de receptores TRPV1, BCTC (300 µg), foram administrados 15 minutos antes da administração do NGF (3 µg). As doses de K-252a e BCTC usadas foram baseadas em estudos anteriores (KANAI et al., 2007; PELEGRINI-DA-SILVA et al, 2008).
Avaliar a participação dos mastócitos locais na hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF.	Para reduzir a responsividade dos mastócitos locais, o CP48/80, que é um indutor da degranulação dessas células foi administrado diariamente em doses crescentes (1, 3, 10 e 10 µg) durante 4 dias, conforme protocolo descrito anteriormente por Andrade et al. (2008) e Perin-Martins et al. (2013). No dia 5 (24 h após a administração da quarta dose do CP48/80), um grupo de animais foi selecionado para confirmar a eficácia do protocolo em reduzir a responsividade dos mastócitos (ver item 5.8 da seção de métodos), enquanto outro grupo foi tratado com NGF (3 µg) para a avaliação da hiperalgesia ao calor.

Fonte: o autor (2016).

Nos protocolos experimentais utilizados para avaliar a participação do NGF na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por CION, a responsividade basal dos animais frente à estimulação da região facial pelos estímulos correspondentes foi determinada antes da cirurgia (sham ou CION) e no dia 4 ou 20 após o procedimento. Como relatado anteriormente pelo nosso grupo, 4 a 6 dias após a cirurgia CION é o período em que a hiperalgesia ao calor e ao frio são mais pronunciadas (CHICHORRO et al., 2006b; 2009), enquanto que a hiperalgesia mecânica atinge seus valores máximos entre 16 e 20 dias após CION (CHICHORRO et al., 2006a). A presença de hiperalgesia térmica e mecânica após CION foi determinada em cada experimento antes do tratamento com qualquer uma das drogas. Os animais dos grupos controles (sham ou CION) foram tratados com os respectivos veículos das drogas testadas.

Tabela 2. Protocolos experimentais utilizados para avaliar a participação do NGF na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por CION

Objetivos	Protocolos experimentais utilizados para atingir os objetivos
Avaliar o efeito do anti-NGF na hiperalgesia ao calor e ao frio induzidas por CION.	O anti-NGF foi administrado nas doses de 1 ou 3 µg, no 4º dia após a cirurgia.
Avaliar o efeito do anti-NGF na hiperalgesia mecânica induzida por CION.	O anti-NGF foi administrado na dose de 3 µg, no 20º dia após a cirurgia.
Avaliar os níveis de NGF nos ramos infraorbitais de ratos submetidos à CION e que desenvolveram hiperalgesia ao calor.	No 4º dia após CION, foi realizada a avaliação da responsividade de ratos frente à estimulação da face por calor, para confirmar o desenvolvimento de hiperalgesia em ratos submetidos à CION. . Na sequência, foi realizada a coleta da porção periférica do nervo infraorbital, ipsi e contralateral à cirurgia, para avaliação dos níveis de NGF através do ELISA.

Fonte: o autor (2016).

Para avaliar o papel da NT-3 no processamento nociceptivo em ratos naïve a resposta basal frente à estimulação da região facial por calor foi avaliada

antes de qualquer tratamento. Os animais dos grupos controles foram tratados com os respectivos veículos das drogas testadas.

Tabela 3. Protocolos experimentais utilizados para avaliar o papel da NT-3 no processamento nociceptivo em ratos naïve

Objetivos	Protocolos experimentais utilizados para atingir os objetivos
Avaliar se a administração de NT-3 induz hiperalgesia térmica ao calor.	A NT-3 foi administrada na dose de 1 µg e a avaliação da latência para a resposta frente à estimulação térmica da face por calor foi avaliada a cada 1 hora, durante 6 horas.
Avaliar o efeito da administração de NT-3 sobre a hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF.	A NT-3 (1 µg) foi administrada 30 minutos antes do NGF (3 µg) e a hiperalgesia ao calor foi avaliada a cada 1 hora, durante 6 horas após a administração do NGF.
Avaliar o efeito da administração de NT-3 sobre a hiperalgesia ao calor induzida por capsaicina.	A NT-3 (1 µg) foi administrada 10 minutos antes da capsaicina (1 µg) e a hiperalgesia ao calor foi avaliada a cada 0,5 hora, durante 3 horas após a administração da capsaicina.

Fonte: o autor (2016).

Para avaliar a participação da NT-3 na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por CION, a responsividade basal dos animais frente à estimulação da região facial pelos estímulos correspondentes foi determinada antes da cirurgia (sham ou CION) e nos dias 4 ou 20 após o procedimento. A presença de hiperalgesia térmica e mecânica após CION foi determinada em cada experimento antes do tratamento com qualquer uma das drogas. Os animais dos grupos controles (sham ou CION) foram tratados com os respectivos veículos das drogas testadas.

Tabela 4. Protocolos experimentais utilizados para avaliar a participação da NT-3 na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por CION

Objetivos	Protocolos experimentais utilizados para atingir os objetivos
Avaliar se a administração da NT-3 reduz a hiperalgesia ao calor induzida por CION.	No 4º dia após a cirurgia, a NT-3 foi administrada nas doses de 0,3 e 1 µg, e a hiperalgesia ao calor foi avaliada em intervalos de 1 hora, durante 6 horas. As doses de NT-3 foram baseadas num estudo anterior (WATANABE et al., 2000).
Avaliar os níveis de NT-3 nos ramos infraorbitais de ratos submetidos à CION e que desenvolveram hiperalgesia ao calor.	No 4º dia após CION, foi realizada a avaliação da responsividade de ratos frente à estimulação da face por calor, para confirmar o desenvolvimento de hiperalgesia em ratos submetidos à CION. Na sequência, foi realizada a coleta da porção periférica do nervo infraorbital, ipsi e contralateral à cirurgia, para avaliação dos níveis de NT-3 através do ELISA.
Avaliar se os receptores Trk contribuem para o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor induzida por CION.	No 4º dia após a cirurgia, o inibidor não-seletivo de receptores Trk, K-252a, foi administrado na dose de 1 µg e a hiperalgesia ao calor foi avaliada em intervalos de 1 hora, durante 6 horas.
Avaliar se os receptores Trk contribuem para o efeito anti-hiperalgésico da NT-3 em animais submetidos à CION.	No 4º dia após a cirurgia, o K-252a (1 µg) foi administrado 15 minutos antes da NT-3 (1 µg) e a hiperalgesia ao calor foi avaliada em intervalos de 1 hora, durante 6 horas após a administração da NT-3.
Avaliar o efeito da associação de doses ineficazes de NT-3 e anti-NGF, determinadas nesse trabalho, na hiperalgesia ao calor induzida por CION.	No 4º dia após a cirurgia, a NT-3 (0,3 µg) e o anti-NGF (1 µg) foram administrados concomitantemente e a hiperalgesia ao calor foi avaliada em intervalos de 1 hora, durante 6 horas.
Avaliar se a administração da NT-3 reduz a hiperalgesia ao frio induzida por CION.	No 4º dia após a cirurgia, a NT-3 foi administrada na dose de 1 µg, e a hiperalgesia ao frio foi avaliada em intervalos de 1 hora, durante 6 horas.

Tabela 4. Continuação...

Objetivos	Protocolos experimentais utilizados para atingir os objetivos
Avaliar se a administração da NT-3 reduz a hiperalgesia mecânica induzida por CION.	No 20º dia após a cirurgia, a NT-3 foi administrada na dose de 1 µg, e a hiperalgesia mecânica foi avaliada em intervalos de 1 hora, durante 6 horas.

Fonte: o autor (2016).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão das médias (E.P.M) do número de animais por grupo, os quais foram calculados pelos programas Statistica 7 e GraphPad Prisma 5. Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi empregada para avaliar estatisticamente a influência dos tratamentos na hiperalgesia térmica e mecânica, sendo o tratamento considerado o fator independente e os diferentes tempos avaliados considerados as medidas repetidas. Quando encontradas diferenças significativas no fator independente e/ou na interação entre o fator independente e os fatores repetidos, ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de *Duncan* foi aplicado. ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de *Newman-Keuls*, foi utilizada na análise do *grooming* facial induzido pelo CP48/80 e nas análises dos níveis de NGF e NT-3. Em todas as análises, valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

6 RESULTADOS

6.1 HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA NA REGIÃO FACIAL PELA ADMINISTRAÇÃO DE NGF EM RATOS NAÏVE

A administração do NGF na dose de 3 µg/50 µL no lábio superior direito (s.c.) dos animais promoveu o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor na região facial da 1ª a 6ª hora, sendo observado um pico de hiperalgesia na 4ª hora (Fig. 3A), em comparação ao grupo de animais tratados com veículo (50 µL). A administração do NGF na dose de 1 µg/50 µL também foi capaz de induzir hiperalgesia ao calor da 2ª a 5ª hora (Fig. 3A).

A administração local do anti-NGF (3 µg/50 µL, s.c.) 1 hora antes da administração do NGF (3 µg/50 µL, s.c.) foi efetiva em reduzir a hiperalgesia ao calor na região facial da 3ª a 6ª hora após a administração do NGF (Fig. 3B). Adicionalmente, a administração local do anti-NGF (3 µg/50 µL, s.c.) não modificou significativamente a latência para a resposta frente à estimulação térmica dos animais do grupo controle tratados com veículo (50 µL, Fig. 3B).

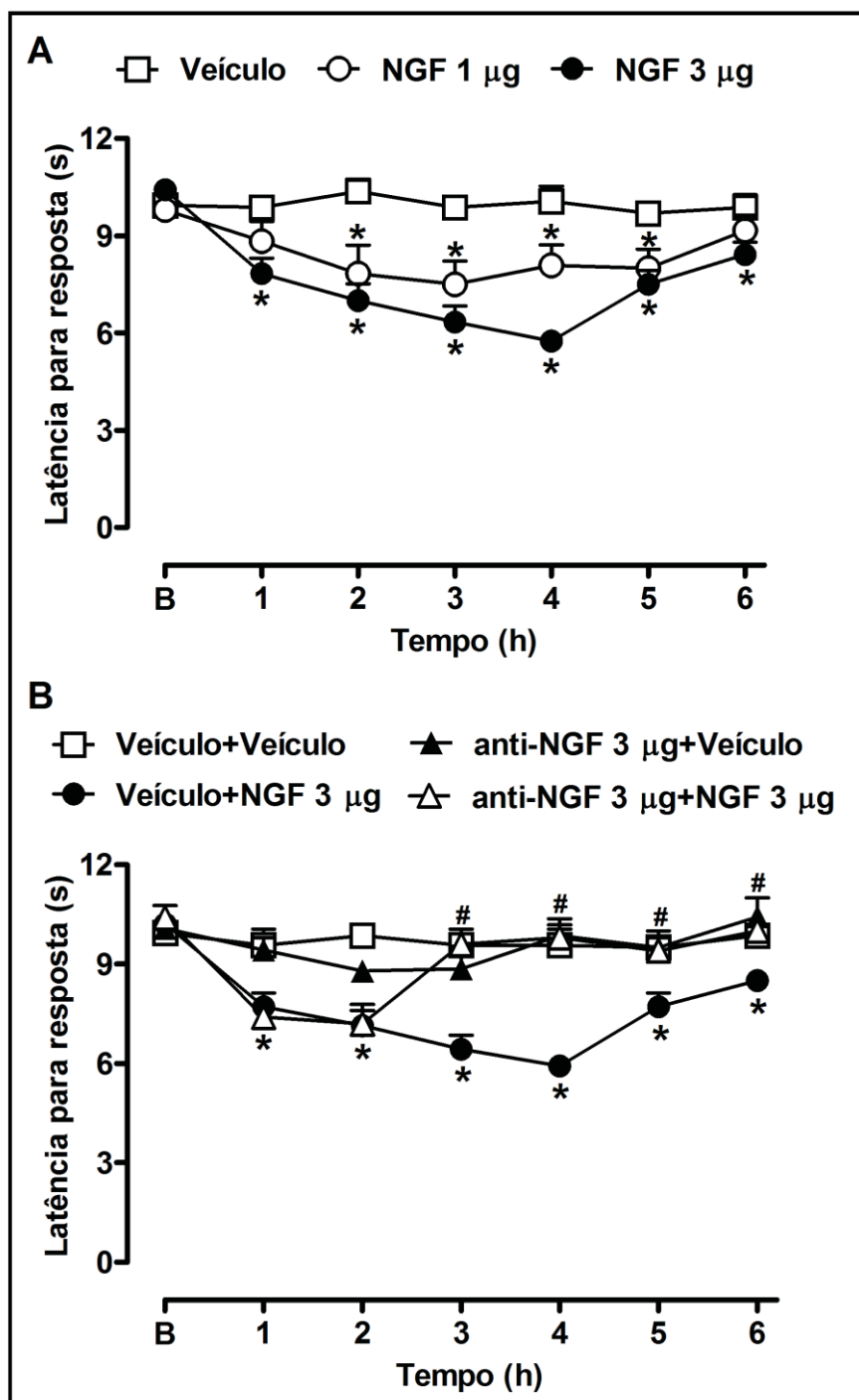


Fig. 3. Hiperalgesia ao calor induzida na região facial pela administração de NGF em ratos naïve. A latência para a resposta frente à estimulação por calor foi avaliada antes (B) e em intervalos de 1 h durante 6 h após a administração local de veículo ou NGF (3 µg) (**painel A**), e de veículo ou NGF (3 µg) administrados 1 h após o tratamento local com veículo ou anti-NGF (3 µg) (**painel B**). Os valores representam a média \pm E.P.M. de 5-8 ratos. * indica $p < 0.05$ em comparação ao grupo tratado com veículo e # indica $p < 0.05$ do grupo anti-NGF 3 µg+NGF 3 µg versus Veículo+NGF 3 µg (ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*).

6.2 MECANISMOS ASSOCIADOS À HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA PELO NGF NA REGIÃO FACIAL DE RATOS NAIVE

A administração do inibidor de receptores Trk, K-252a (1 µg/50 µL), no lábio superior direito de animais naive (s.c.) 15 minutos antes da administração do NGF (3 µg/50 µL, s.c.), foi capaz de prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF na região facial (Fig. 4A). De forma semelhante, a administração local do antagonista de receptores TRPV1, BCTC (300 µg/50 µL, s.c.), 15 minutos antes da administração do NGF (3 µg/50 µL, s.c.), reduziu a hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF na região facial 3 e 4 horas após a administração (Fig. 4B). A administração local do K252a (1 µg/50 µL) ou do BCTC (300 µg/50 µL) em animais do grupo controle, que foram tratados 15 minutos após com veículo (50 µL), não alterou de forma significativa a latência para a resposta dos mesmos frente à estimulação térmica (Fig. 4).

A redução da responsividade dos mastócitos locais induzida pela degranulação prévia dessas células através da administração repetida do Composto 48/80 (CP48/80) no lábio superior direito de animais naïve, reduziu em aproximadamente 65% o tempo de *grooming* facial induzido pela administração local do CP48/80 (10 µg/50, s.c.), quando comparado aos animais do grupo controle tratados repetidamente com veículo (50 µL, Fig. 5A). Além deste efeito, a redução da responsividade dos mastócitos locais também foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor na região facial induzida pela administração de NGF (3 µg/50 µL, s.c.), na 2^a, 3^a e 4^a hora após a administração deste, mas não de alterar a latência para a resposta frente à estimulação da região facial por calor dos animais do grupo controle tratados com veículo (50 µL, Fig. 5B).

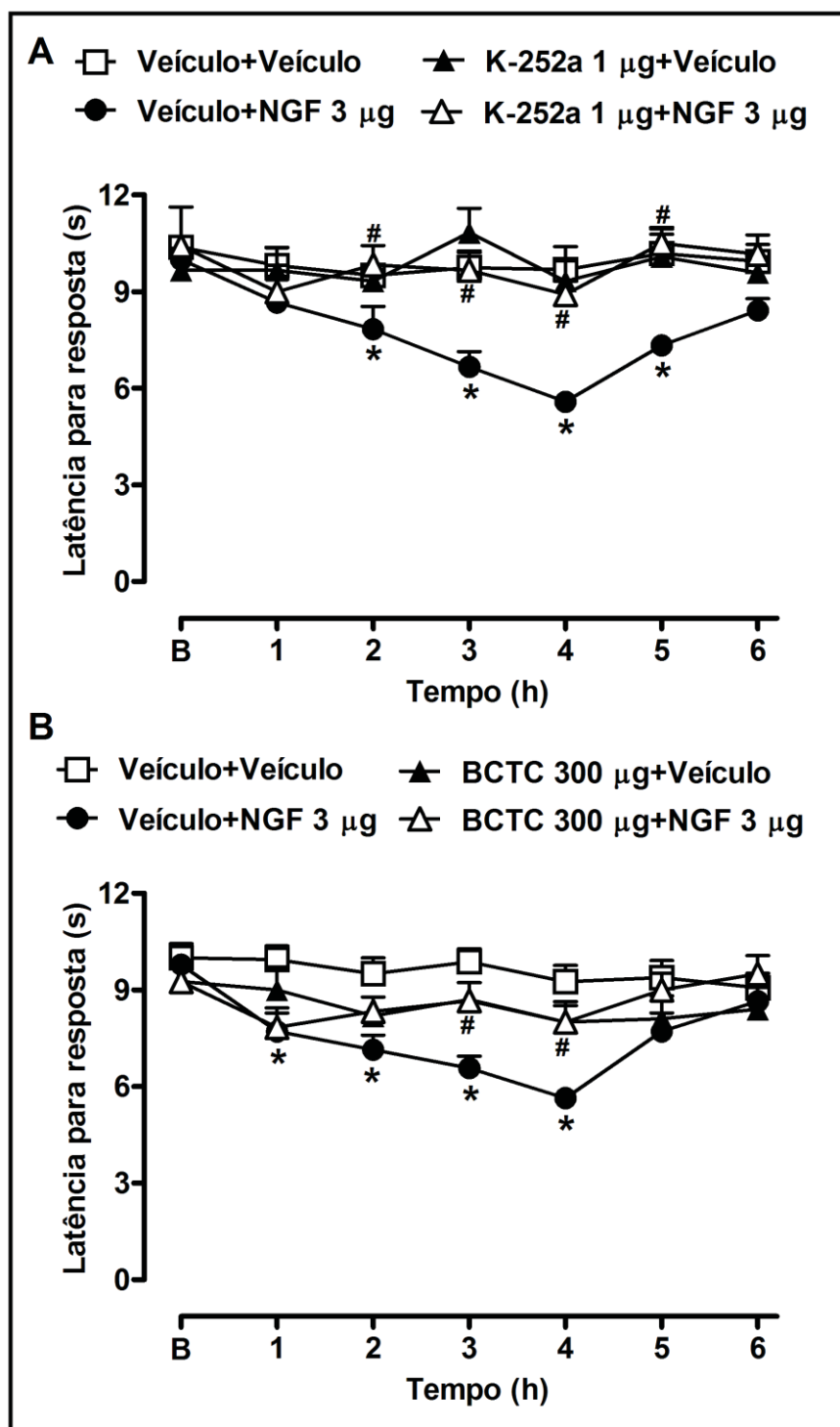


Fig. 4. Envolvimento dos receptores Trk e TRPV1 na hiperalgesia ao calor induzida na região facial pela administração de NGF em ratos naïve. A latência para a resposta frente à estimulação por calor foi avaliada antes (B) e em intervalos de 1 h durante 6 h após a administração local de veículo ou NGF (3 μ g), os quais foram administrados 15 min após o tratamento local com o inibidor de receptores Trk, K-252a (1 μ g, **painel A**); com o antagonista de receptores TRPV1, BCTC (300 μ g, **painel B**), ou com seus respectivos veículos. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 5-8 ratos. * e # indicam $p < 0.05$ em comparação aos grupos Veículo+Veículo e Veículo+NGF 3 μ g, respectivamente (ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*).

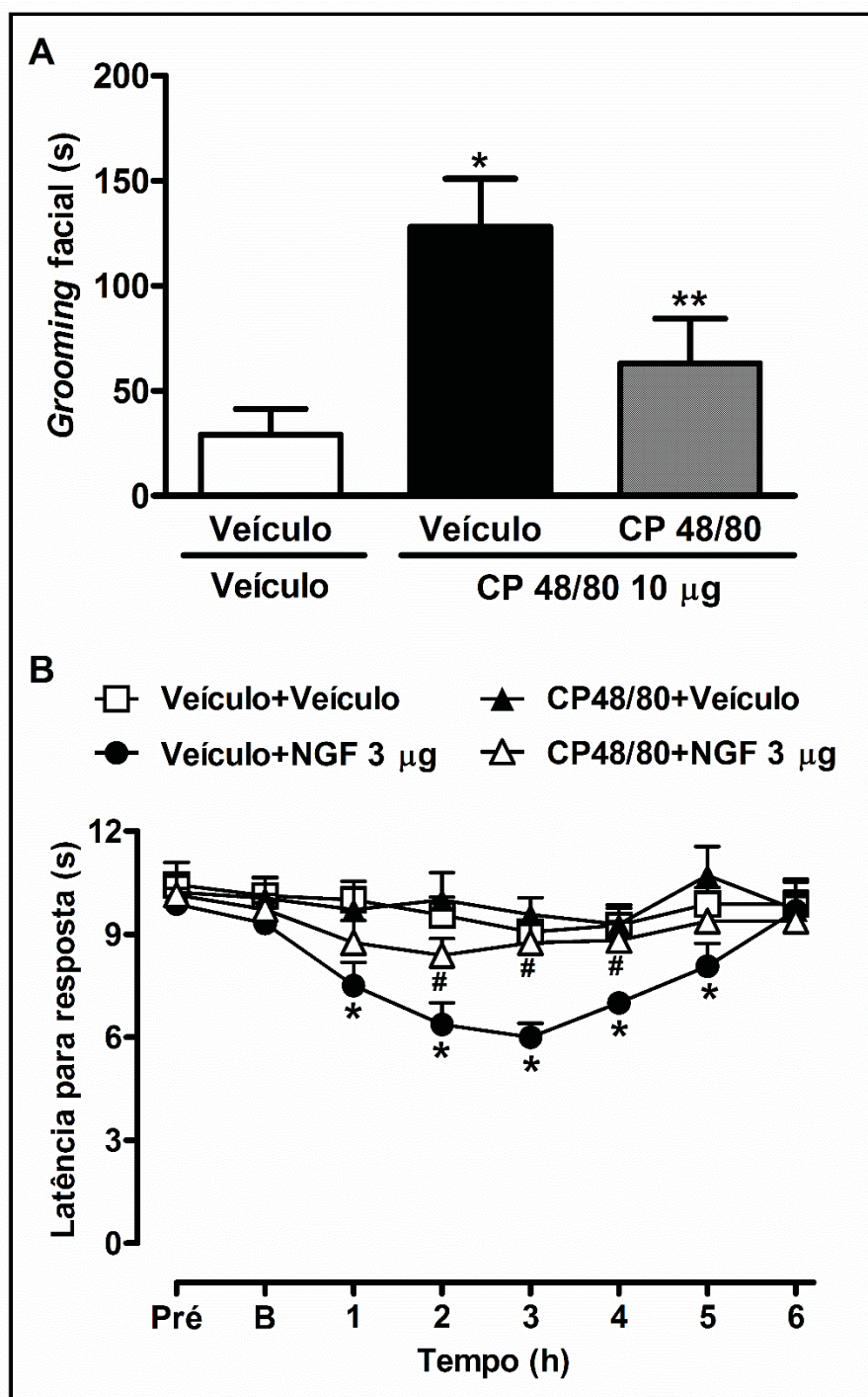


Fig. 5. Participação de mastócitos locais na hiperalgesia ao calor induzida pela administração de NGF na região facial de ratos naïve. O tempo de *grooming* facial foi avaliado durante 30 min após a injeção local do composto 48/80 (CP48/80, 10 µg) ou veículo, 1 dia após o término da administração repetida de veículo ou do CP48/80 (1, 3, 10 e 10 µg) durante 4 dias (**painel A**). A latência para a resposta frente à estimulação por calor foi avaliada antes (Pré) da indução da degranulação dos mastócitos locais pela administração repetida do CP48/80, e no dia 5, antes (B) e em intervalos de 1 h após a administração local de NGF (3 µg) ou veículo (**painel B**). Os valores representam a média ± E.P.M. de 5-8 ratos. *, ** e # indicam $p < 0.05$ em comparação aos grupos Veículo+Veículo, Veículo+CP48/80 10 µg e Veículo+NGF 3 µg, respectivamente (**painel A**: ANOVA de uma via seguida do teste de *Newman-Keuls*; **painel B**: ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*).

6.3 PARTICIPAÇÃO DO NGF NA HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

A administração do anti-NGF na dose de 3 µg/50 µL no lábio superior direito dos animais foi capaz de promover uma redução acentuada da hiperalgesia ao calor na região facial em animais submetidos à CION, sendo este efeito observado durante 4 horas após o tratamento (Fig. 6A). No entanto, a menor dose de anti-NGF testada (1 µg/50 µL) não foi efetiva em reduzir a hiperalgesia ao calor nos mesmos animais (Fig. 6A). Os animais Sham tratados localmente com a maior dose do anti-NGF (3 µg/50 µL) não mostraram qualquer alteração significativa na latência para a resposta frente à estimulação por calor da região facial, em comparação aos animais falso-operados tratados apenas com veículo (50 µL, dados não mostrados).

Ratos submetidos à CION também apresentaram no 4º dia após a constrição níveis significativamente aumentados de NGF no ramo infraorbital ipsilateral à cirurgia, em comparação ao lado contralateral, e em relação a ambos os lados de animais Sham (Fig. 6B).

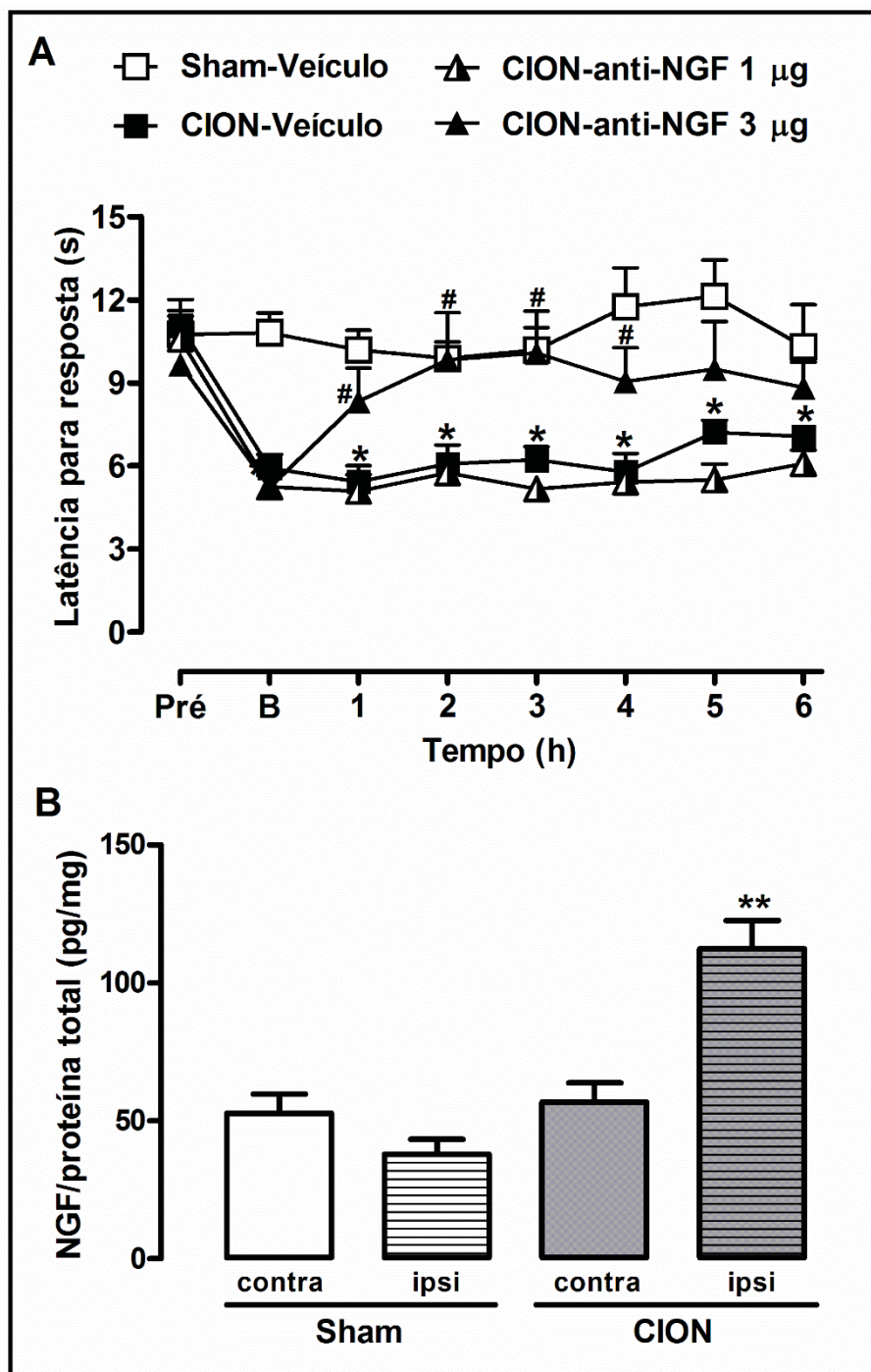


Fig. 6. Participação do NGF na hiperalgesia ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital (CION). A latência para a resposta frente à estimulação por calor foi avaliada antes (Pré) e no dia 4 após CION, antes (B) e em intervalos de 1 h após o tratamento local com anti-NGF (1 ou 3 µg) ou veículo (**painel A**). Os níveis de NGF foram determinados no ramo infraorbital ipsi e contralateral (contra) à cirurgia, no dia 4 após CION (**painel B**). Os valores representam a média \pm E.P.M. de 6-9 ratos (**painel A**), e de 4 amostras por grupo (cada amostra corresponde a um pool de 2 nervos) (**painel B**). * e # indicam $p < 0.05$ em comparação aos grupos Sham e CION tratados com veículo, respectivamente (**A**, ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*). ** indica $p < 0.05$ do grupo CION-ipsi versus CION-contra and Sham-ipsi (**B**, ANOVA de uma via seguida do teste de *Newman-Keuls*).

6.4 NGF NÃO INFLUENCIA A RESPONSIVIDADE DE RATOS NAÏVE OU SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL (CION) FRENTE À ESTIMULAÇÃO DA REGIÃO FACIAL POR FRIO

A administração do NGF nas doses de 1 ou 3 µg/50 µL no lábio superior direito (s.c.) dos animais não foi capaz de modificar significativamente o tempo de *grooming* facial (s) avaliado após a estimulação por frio da região facial (Fig. 7A), em comparação ao grupo de animais tratados com veículo (50 µL).

Em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital (CION), a administração do anti-NGF nas doses de 1 ou 3 µg/50 µL no lábio superior direito dos animais (s.c.) não foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica ao frio na região facial, caracterizada pelo aumento no tempo de *grooming* facial (s) observado no 4º dia após a cirurgia (Fig 7B), em comparação ao animais submetidos à CION tratados com veículo (50 µL). Os animais Sham tratados localmente com veículo (50 µL) não mostraram qualquer alteração significativa no tempo de *grooming* facial após a estimulação por frio da região facial (Fig. 7B).

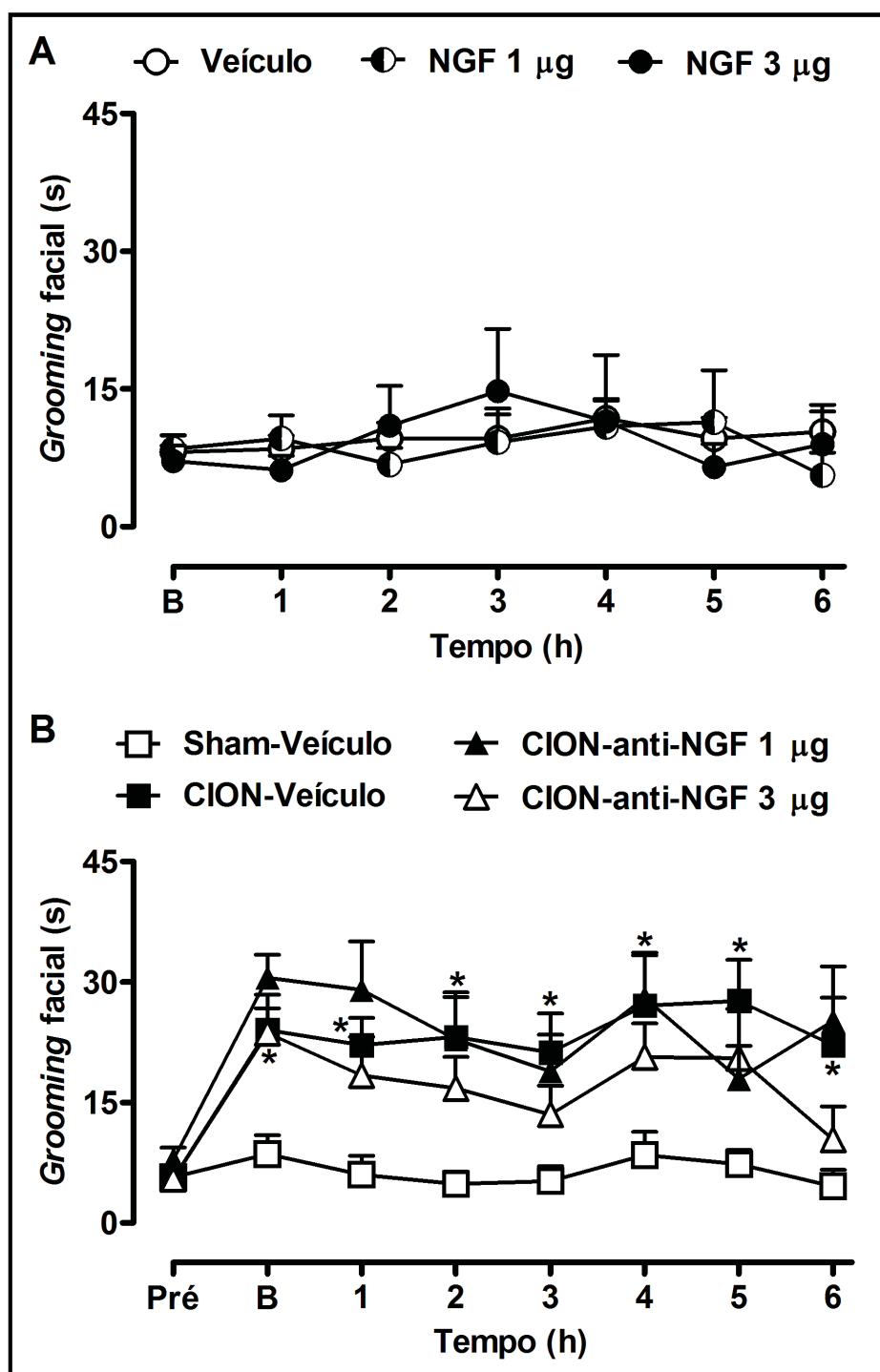


Fig. 7. NGF local não influencia a responsividade de ratos naïve ou submetidos à constricção do nervo infraorbital (CION) frente à estimulação da região facial por frio. Em ratos naïve o *grooming facial* induzido pela estimulação por frio foi avaliado antes (B) e em intervalos de 1 h após a administração local de NGF (1 ou 3 µg) ou veículo (**painel A**). Em ratos submetidos à CION, o *grooming facial* foi avaliado antes (Pré) e no dia 4 após CION, antes (B) e em intervalos de 1 hora após o tratamento local com anti-NGF (1 ou 3 µg) ou veículo (**painel B**). Os valores representam a média ± E.P.M. de 5-8 ratos. * indica $p < 0.05$ do grupo CION-Veículo (hiperalgésico) em comparação ao grupo Sham tratado com veículo (ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*).

6.5 NGF NÃO INFLUENCIA A RESPONSIVIDADE DE RATOS NAÏVE OU SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL (CION) FRENTE À ESTIMULAÇÃO MECÂNICA DA REGIÃO FACIAL

A administração do NGF nas doses de 1 ou 3 $\mu\text{g}/50\text{ }\mu\text{L}$ no lábio superior direito (s.c.) dos animais não foi capaz de modificar significativamente o limiar mecânico (g) frente a estimulação da região facial, em comparação ao grupo de animais tratados com veículo (50 μL), durante as 6 horas seguidas de avaliação (Fig. 8A) ou 24 horas após a administração (dados não mostrados).

Em animais submetidos à CION, a administração do anti-NGF na dose de 3 $\mu\text{g}/50\text{ }\mu\text{L}$ no lábio superior direito dos animais não foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica, caracterizada pela redução do limiar mecânico (g) observado no 20º dia após a cirurgia (Fig. 8B), em comparação aos animais submetidos à CION tratados com veículo (50 μL). Os animais Sham tratados localmente com veículo (50 μL) não mostraram qualquer alteração significativa no limiar mecânico (g) frente à estimulação da região facial (Fig. 8B).

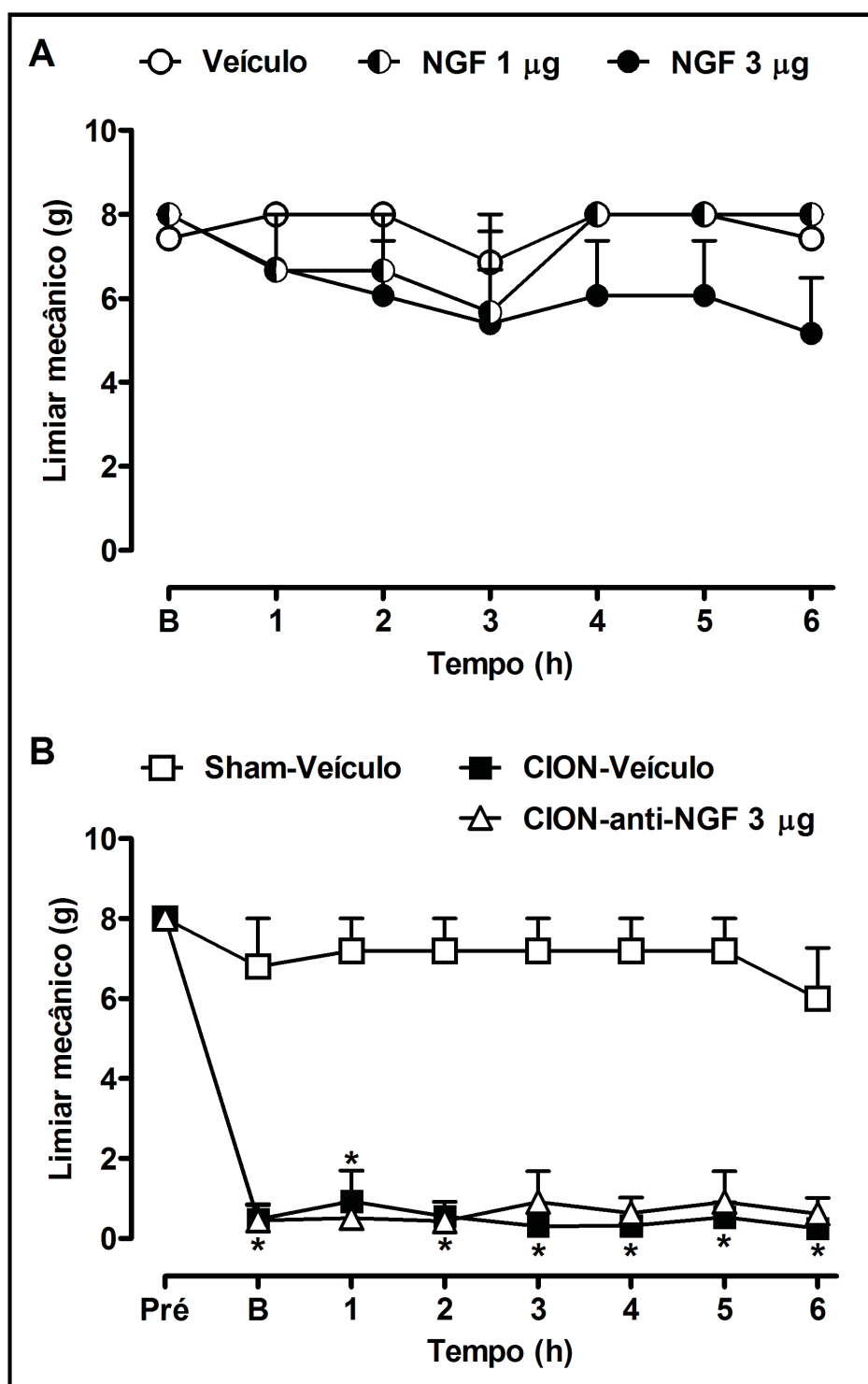


Fig. 8. NGF local não influencia a responsividade de ratos naïve ou submetidos à constrição do nervo infraorbital (CION) frente à estimulação mecânica da região facial. Em ratos naïve o limiar mecânico foi avaliado antes (B) e em intervalos de 1 h após a administração local de NGF (1 ou 3 μ g) ou veículo (**painel A**). Em ratos submetidos à CION, o limiar mecânico foi avaliado antes (Pré) e no dia 20 após CION, antes (tempo 0) e em intervalos de 1 hora após o tratamento local com anti-NGF (3 μ g) ou veículo (**painel B**). Os valores representam a média \pm E.P.M. de 3-7 ratos. * indica $p < 0.05$ do grupo CION-Veículo (hiperalgésico) em comparação ao grupo Sham tratado com veículo (ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*).

6.6 NT-3 NÃO MODIFICA A RESPOSTA DE ANIMAIS NAÍVE FRENTE À ESTIMULAÇÃO DA REGIÃO FACIAL POR CALOR

A administração de NT-3 na dose de 1 µg/50 µL no lábio superior direito (s.c.) não promoveu qualquer alteração significativa na latência para a resposta frente à estimulação da região facial por calor (Fig. 9), em comparação aos animais tratados com veículo (50 µL).

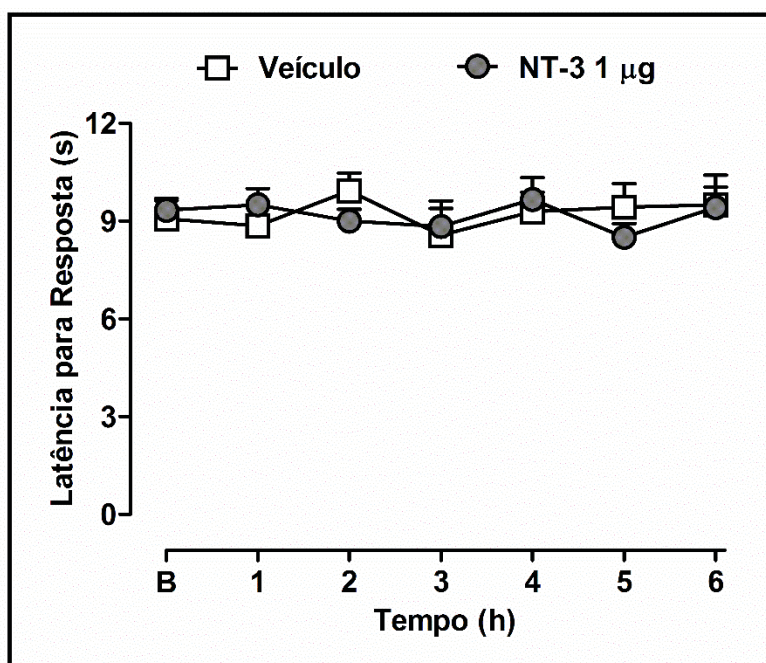


Fig. 9. NT-3 local não modifica a responsividade de animais naïve frente à estimulação da região facial por calor. Em ratos naïve a latência para a resposta foi avaliada antes (B) e em intervalos de 1 h após a administração local de NT-3 (1 µg) ou veículo. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 3-7 ratos (ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*).

6.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA NT-3 SOBRE A HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA NA REGIÃO FACIAL PELA ADMINISTRAÇÃO DE NGF OU CAPSAICINA EM RATOS NAÏVE

A administração do NGF na dose de 3 µg/50 µL no lábio superior direito promoveu o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor na região facial da 2^a a 6^a hora (Fig. 10A), em comparação ao grupo de animais tratados com veículo (50 µL). Por outro lado, a administração local da NT-3 (1 µg/50 µL), 30 minutos antes da administração do NGF (3 µg/50 µL), foi capaz de prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor induzida pelo NGF na região facial (Fig. 10A).

A administração da capsaicina na dose de 1 µg/50 µL, no lábio superior direito, promoveu o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor na região facial entre meia hora e 2 horas após a sua administração (Fig. 10B), em comparação ao grupo de animais tratados com veículo (50 µL). Porém, a administração local da NT-3 (1 µg/50 µL), 10 minutos antes da administração da capsaicina (1 µg/50 µL), reduziu significativamente a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela capsaicina, 1,5 e 2 horas após a administração (Fig. 10B).

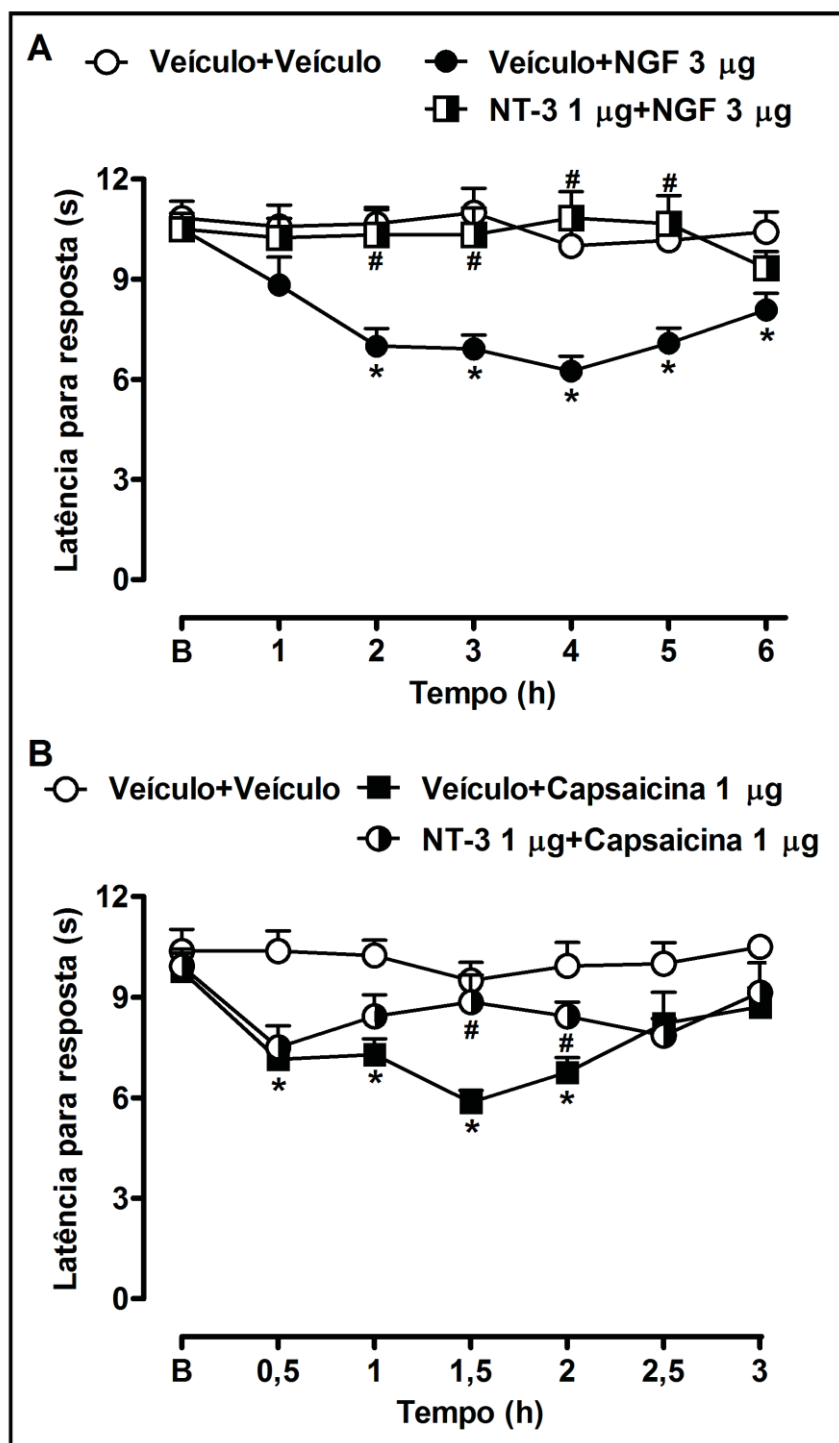


Fig. 10. NT-3 reduz a hiperalgesia ao calor induzida na região facial pela administração de NGF ou capsaicina em ratos naïve. A latência para a resposta frente à estimulação por calor foi avaliada antes (B) e em intervalos de 1 h após a administração local de veículo ou NGF (3 μ g), os quais foram administrados 30 min após o tratamento local com NT-3 (1 μ g) (**painel A**); e após a administração local de veículo ou capsaicina (1 μ g), os quais foram administrados 10 min após o tratamento local com NT-3 (1 μ g) (**painel B**). Os valores representam a média \pm E.P.M. de 6-8 ratos. * indica $p < 0.05$ em comparação ao grupo tratado com veículo (**A, B**) e # indica $p < 0.05$ em comparação ao grupo Veículo+NGF 3 μ g (**painel A**) e ao grupo Veículo+Capsaicina 1 μ g (**painel B**) (ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*).

6.8 PARTICIPAÇÃO DA NT-3 NA HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

A administração da NT-3 na dose de 1 µg/50 µL no lábio superior direito dos animais submetidos à CION foi capaz de promover uma redução persistente da hiperalgesia ao calor na região facial, sendo este efeito observado durante 5 horas após o tratamento (Fig. 11A). No entanto, a menor dose de NT-3 testada, 0,3 µg/50 µL, não foi efetiva em reduzir a hiperalgesia ao calor nos mesmos animais (Fig. 11A). Os animais Sham tratados localmente com a maior dose da NT-3 (1 µg/50 µL) não mostraram qualquer alteração significativa na latência para a resposta frente à estimulação por calor da região facial, em comparação aos animais Sham tratados apenas com veículo (50 µL, Fig. 11A).

Ratos submetidos à CION também apresentaram no 4º dia após a constrição níveis significativamente aumentados de NT-3 no ramo infraorbital ipsilateral à cirurgia, em comparação ao lado contralateral, e em relação a ambos os lados de animais Sham (Fig. 11B).

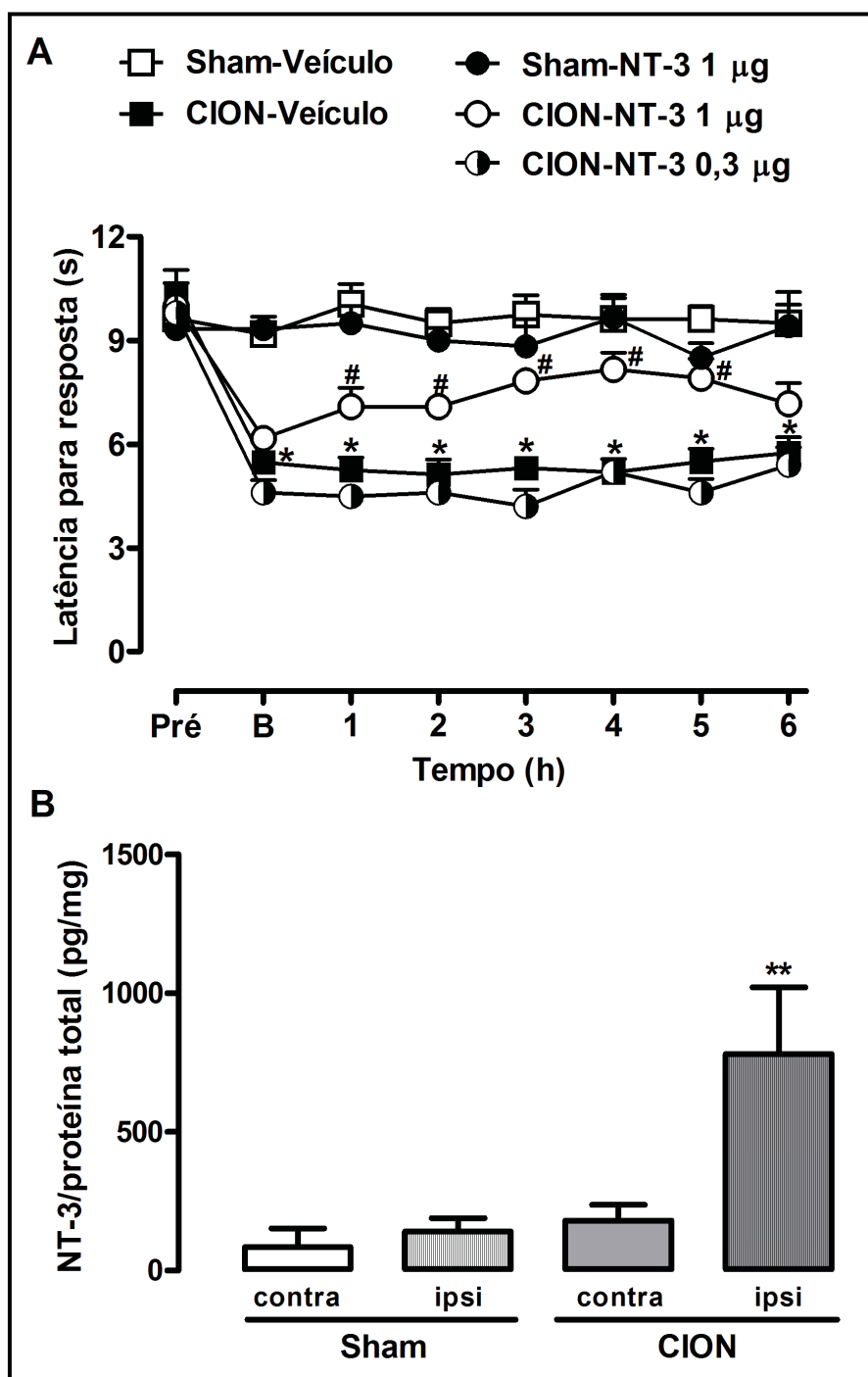


Fig. 11. Participação da NT-3 na hiperalgesia ao calor induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital (CION). A latência para a resposta frente à estimulação por calor foi avaliada antes (Pré) e no dia 4 após CION, antes (B) e em intervalos de 1 h após o tratamento local com veículo ou NT-3 (0,3 ou 1 μ g) (**painel A**). Os níveis de NT-3 foram determinados no ramo infraorbital ipsi e contralateral (contra) à cirurgia, no dia 4 após CION (**painel B**). Os valores representam a média \pm E.P.M. de 5-8 ratos (**painel A**) e de 5 amostras por grupo (cada amostra corresponde a um pool de 2 nervos) (**painel B**). * e # indicam $p < 0.05$ em comparação aos grupos Sham e CION tratados com veículo, respectivamente (**painel A**, ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*). ** indica $p < 0.05$ do grupo CION-ipsi versus CION-contralateral and Sham-ipsi (**painel B**, ANOVA de uma via seguida do teste de *Newman-Keuls*).

6.9 PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES Trk NO EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA NT-3 FRENTE À ESTIMULAÇÃO POR CALOR DA REGIÃO FACIAL DE RATOS SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

A administração do inibidor de receptores Trk, K-252a (1 µg/50 µL), no lábio superior direito dos animais, reduziu discretamente a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital (CION), na 3^a e 5^a hora após o tratamento (Fig. 12A). Os animais Sham tratados localmente com o K-252a (1 µg/50 µL) não mostraram qualquer alteração significativa na latência para a resposta frente à estimulação por calor da região facial, em comparação aos animais Sham tratados apenas com veículo (50 µL, Fig. 12A).

No entanto, a administração do inibidor de receptores Trk, K-252a (1 µg/50 µL) no lábio superior direito dos animais submetidos à CION, 15 minutos antes da administração da NT-3 (1 µg/50 µL), foi capaz de bloquear o efeito anti-hiperalgésico desta neurotrofina, observado da 2^a a 5^a hora em animais tratados previamente apenas com veículo (50 µL, Fig. 12B).

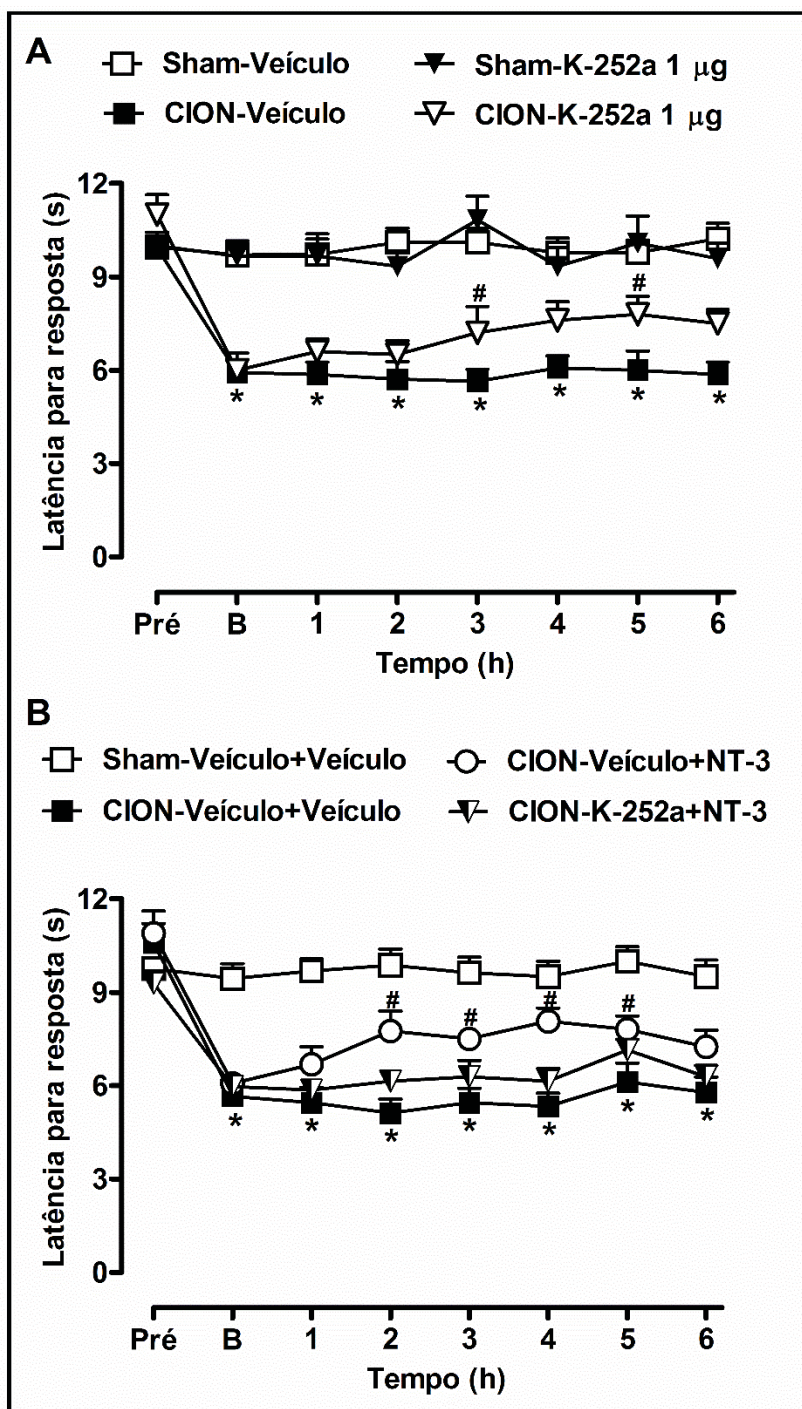


Fig. 12. Participação dos receptores Trk no efeito anti-hiperalgésico da NT-3 na hiperalgesia ao calor induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital (CION). A latência para a resposta frente à estimulação por calor foi avaliada antes (Pré) e no dia 4 após CION, antes (B) e em intervalos de 1 h após o tratamento local com veículo ou com o inibidor de receptores Trk, K252a (1 µg) (**painel A**); e após o tratamento local com NT-3 (1 µg) administrada 15 min após a administração do K252a (1 µg) (**painel B**). Os valores representam a média ± E.P.M. de 5-9 ratos. * e # indicam $p < 0.05$ em comparação aos grupos Sham e CION tratados apenas com veículo, respectivamente (ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*).

6.10 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE DOSES INEFICAZES DE NT-3 E ANTI-NGF NA HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

A administração concomitante de NT-3 (0,3 µg) e anti-NGF (1 µg) no lábio superior direito, ou seja, em doses que não foram capazes de modificar a hiperalgesia ao calor quando administradas isoladamente, foi capaz de promover uma redução acentuada da hiperalgesia térmica ao calor na região facial, sendo este efeito observado durante 4 horas após a administração (Fig. 13), em comparação a animais submetidos à CION tratados apenas com veículo (50 µL).

Os animais Sham tratados localmente com NT-3+anti-NGF (0,3 µg +1 µg/50 µL, respectivamente) não mostraram qualquer alteração significativa na latência para a resposta frente à estimulação da região facial por calor, em comparação aos animais Sham tratados apenas com veículo (50 µL, Fig. 13).

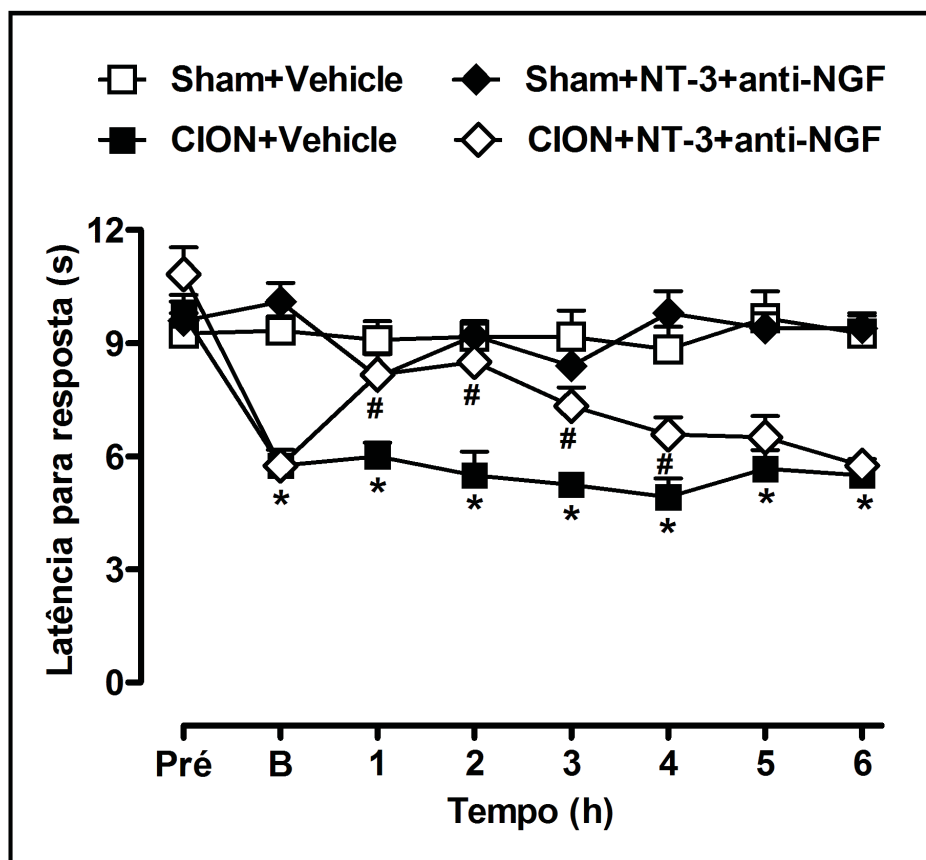


Fig. 13. Associação de doses ineficazes de NT-3 e anti-NGF reduz a hiperalgesia ao calor induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital (CION). A latência para a resposta frente à estimulação térmica por calor foi avaliada antes (Pré) e no dia 4 após CION, antes (B) e em intervalos de 1 h após o tratamento com NT-3+anti-NGF (0,3+1 µg, respectivamente) ou veículo. Os valores representam a média ± E.P.M. de 5-6 ratos. * e # indicam $p < 0.05$ em comparação aos grupos Sham e CION tratados com veículo, respectivamente (ANOVA para medidas repetidas seguida do teste de *Duncan*).

6.11 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA NT-3 NA HIPERALGESIA AO FRIO E MECÂNICA INDUZIDAS PELA CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

A administração de NT-3 nas doses de 0,3 ou 1 µg/50 µL no lábio superior direito dos animais não foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio na região facial, caracterizada pelo aumento no tempo de *grooming* facial avaliado no 4º dia após a cirurgia (Fig. 14A), em comparação aos animais submetidos à CION tratados com veículo (50 µL). Os animais Sham tratados localmente com veículo (50 µL) não mostraram qualquer alteração significativa no tempo de *grooming* facial após a estimulação da região facial por frio (Fig. 14A).

De forma semelhante, a administração da NT-3 na dose de 1 µg/50 µL, no lábio superior direito dos animais, não foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica, caracterizada pela redução do limiar mecânico avaliado no 20º dia após a cirurgia (Fig. 14B), em comparação aos animais submetidos à CION tratados com veículo (50 µL). Os animais Sham tratados localmente com veículo (50 µL) não mostraram qualquer alteração significativa no limiar mecânico frente à estimulação da região facial (Fig. 14B).

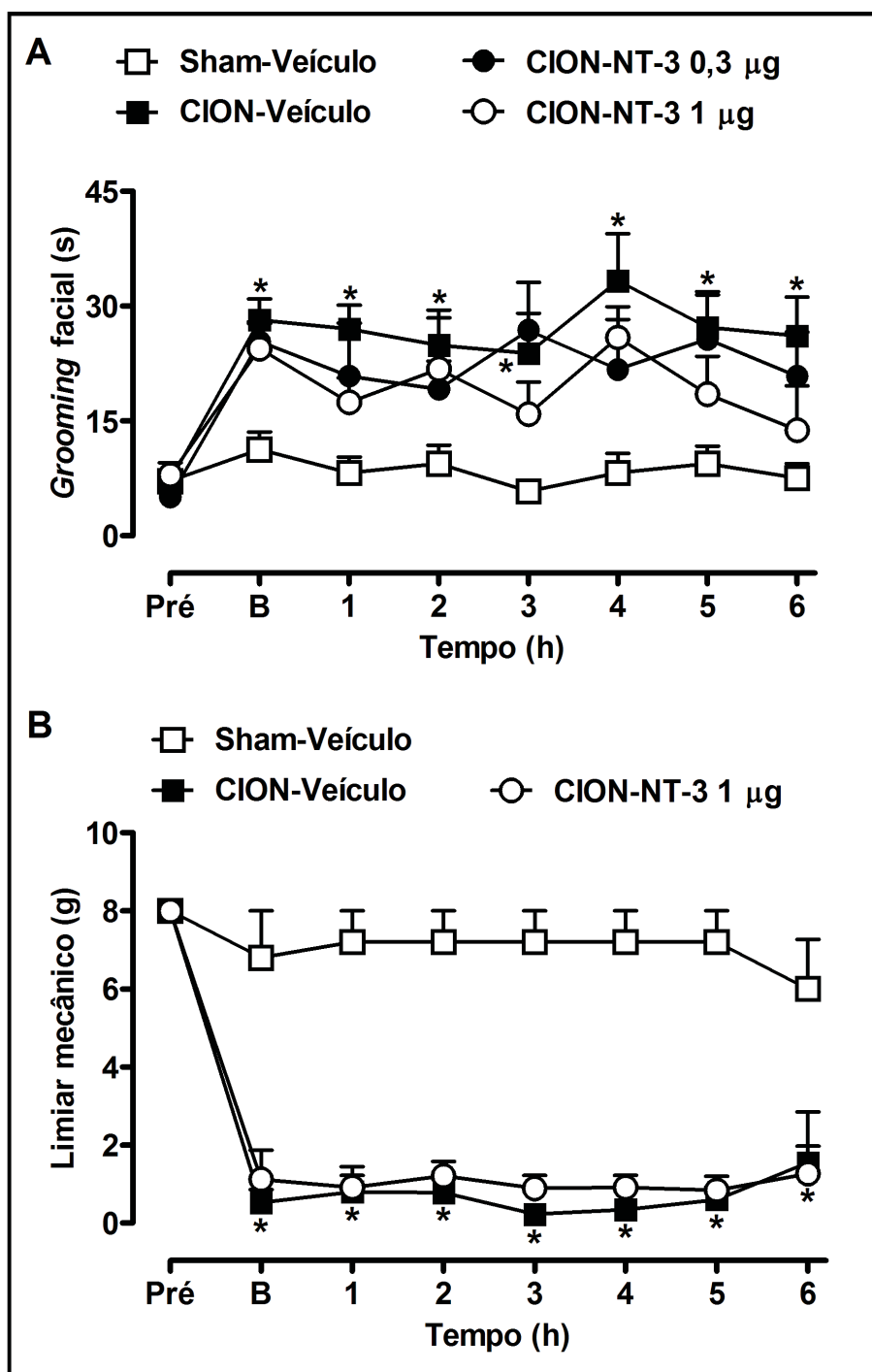


Fig. 14. NT-3 administrada localmente não modifica a hiperalgesia ao frio e mecânica induzidas na região facial pela constrição do nervo infraorbital (CION). O *grooming* facial induzido pela estimulação da região facial por frio (**painel A**) e o limiar mecânico (**painel B**) foram avaliados antes (Pré) e nos dias 4 (**painel A**) ou 20 (**painel B**) após CION, antes (B) e em intervalos de 1 hora após o tratamento local com NT-3 (0,3 ou 1 μg) ou veículo. Os valores representam a média ± E.P.M. de 5-10 ratos. * indica $p < 0.05$ do grupo CION-Veículo (hiperalgésico) em comparação ao grupo Sham tratado com veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de *Duncan*).

7 DISCUSSÃO

7.1 INFLUÊNCIA DO NGF NO PROCESSAMENTO NOCICEPTIVO TRIGEMINAL

Os resultados desse estudo mostram que a administração de NGF no lábio superior promove o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor, a qual é mediada por receptores TrkA e envolve a participação de receptores TRPV1 e de mastócitos locais. Além disso, foi verificado que a neutralização local do NGF reverte a hiperalgesia ao calor induzida por este fator, assim como a hiperalgesia ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital (CION), e não modifica a responsividade basal dos animais. (DOS REIS et al., 2016) No entanto, foi observado que a administração local de NGF em animais naïve ou seu bloqueio em animais submetidos à CION não modifica a responsividade destes frente à estimulação por frio ou frente à estimulação mecânica da região facial.

A capacidade do NGF para induzir hiperalgesia ao calor tem sido extensivamente relatada, inclusive em humanos (LEWIN et al., 1994; RUEFF et al., 1996; RUKWIED et al., 2010; WEINKAUF et al., 2012). Nesse estudo foi observado o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor na região facial após administração local de NGF, de forma semelhante ao observado quando o NGF foi administrado via intraplantar (MILLS et al., 2013). Além disso, no estudo de Shinoda et al. (2011), a administração local repetida de NGF também foi capaz de induzir hiperalgesia ao calor na região facial, corroborando nossos dados.

Dentre os mecanismos envolvidos na hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF, a ligação do NGF aos receptores TrkA tem um papel relevante (McMAHON et al., 1994). Considerando que a administração local do inibidor de receptores Trk, o K-252a, foi capaz de abolir a hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF na região facial, nosso estudo reforça a importância dos receptores TrkA para as ações do NGF no sistema trigeminal. Apesar do K-252a não ser um inibidor seletivo de receptores TrkA, além de ter a capacidade de inibir outras proteínas quinases (HASHIMOTO et al., 1991), é possível inferir que o efeito do K-252a sobre a hiperalgesia do NGF seja decorrente da inibição dos receptores TrkA, considerando que concentrações de ordem nanomolar deste composto são

suficientes para inibir estes receptores (TAPLEY et al., 1992) e que as ações pró-nociceptivas do NGF são mediadas principalmente pela sua ligação a receptores TrkA. Corroborando nossos dados, outros estudos demonstraram que o tratamento com o K-252a reduziu a nocicepção espontânea induzida pela administração de NGF em articulação temporomandibular de rato previamente sensibilizada, assim como a hiperalgesia ao calor na região facial induzida pela administração de CFA (KNIGHT et al., 1997; PELLEGRINI-DA-SILVA et al., 2008; SHINODA et al., 2011).

A ligação do NGF aos receptores TrkA ativa diferentes vias de sinalização intracelulares que medeiam a sensibilização dos receptores TRPV1. Dentre estas, estudos mostraram que as sinalizações mediadas por PKA, PI3K ou PLC γ /PKC ϵ participam da sensibilização de neurônios do DRG por NGF (BONNINGTON E MCNAUGHTON, 2003; SHU E MENDELL, 2001; ZHANG et al., 2005). Nesse sentido foi demonstrado que a PIP2 endógena na membrana do nociceptor inibe os receptores TRPV1 e que a ativação dos receptores TrkA pela PLC γ induz o metabolismo da PIP2 desinibindo os receptores TRPV1 (CHUANG et al., 2001; PRESCOTT E JULIUS, 2003). Também no estudo de Shu e Mendell (1999) foi demonstrado em neurônios do DRG que o NGF aumenta a resposta inicial à capsaicina e facilita a resposta dessas células a uma segunda exposição, sugerindo que o NGF é capaz de evitar a taquifilaxia dos receptores TRPV1. Desta forma, a redução da hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF na região facial pela administração local do antagonista de receptores TRPV1, o BCTC, corroboram os outros e mostra que a hiperalgesia induzida por NGF é mediada, pelo menos em parte, pela ativação dos receptores TRPV1.

Adicionalmente, tem sido proposto que o desenvolvimento de hiperalgesia térmica induzida por NGF envolve a participação de mastócitos. A importância dessas células tem sido evidenciada por vários autores em diversas síndromes dolorosas (para revisão ver CATTERJEA E MARTINOV, 2015). O envolvimento dos mastócitos no processamento dos estímulos nociceptivos é favorecido pela sua localização próxima às fibras sensoriais, as quais são sensibilizadas ou ativadas por diversos mediadores liberados pela degranulação dessas células. (FORSYTHE E BIENENSTOCK, 2012; REN E DUBNER, 2010). Dentre esses mediadores estão a substância P, o fator de crescimento tumoral α (TNF- α) e

a bradicinina, cuja participação já foi demonstrada num modelo de dor neuropática trigeminal (COELHO et al., 2014; LUIZ et al., 2010; TEODORO et al., 2013), mas também histamina e serotonina (para revisão ver CATTERJEA E MARTINOV, 2015). Especificamente com relação à hiperalgesia induzida pelo NGF, a participação dos mastócitos já foi demonstrada em modelos de inflamação e de dor neuropática induzida por lesão de nervo (AMANN et al., 1996; TAL E LIBERMAN, 1997; THEODOSIOU et al., 1999; WOOLF et al., 1996). Corroborando estas observações *in vivo*, num estudo *in vitro* realizado em pele retirada de animais submetidos à depleção de mastócitos foi observado que o NGF não foi capaz de promover sensibilização térmica (RUEFF E MENDELL, 1996). Considerando as evidências acima e a demonstração no nosso estudo de que a hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF é atenuada pela degranulação de mastócitos locais, é possível inferir um papel para os mastócitos na hiperalgesia térmica induzida por NGF.

Corroborando as evidências de um papel pró-hiperalgésico do NGF, tem sido demonstrado que o bloqueio das ações do NGF pela administração de anticorpo anti-NGF, anti-TrkA ou anti-p75 promovem efeitos antinociceptivos em modelos de inflamação e de dor neuropática (BERNARD-GAUTHIER E SHCIRRMACHER, 2015; DJOURI, 2016; MATSUURA et al., 2013) mas também em humanos (para revisão ver BANNWARTH E KOSTINE, 2014; TISEO et al., 2014). Em modelos animais, para o bloqueio das ações do NGF foram empregadas injeções sistêmicas e/ou repetidas de anticorpo anti-NGF, o que difere do nosso estudo (BANIK et al., 2005; McMAHON et al., 1995; RAMER E BISBY, 1999; RO et al., 1999; SHINODA et al., 2011; WOOLF et al., 1994). No presente estudo, mostramos primeiramente o bloqueio da hiperalgesia ao calor induzida pelo NGF pelo pré-tratamento local com o anticorpo anti-NGF. Além disso, demonstramos que uma única injeção local de uma dose baixa de anti-NGF foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital, indicando o NGF como um alvo periférico importante no controle da dor facial crônica. Corroborando os nossos dados, a hiperalgesia ao calor na região facial induzida pela administração de CFA foi atenuada pela neutralização local de NGF, sugerindo um papel importante dos mecanismos desencadeados pelo NGF perifericamente (SHINODA et al., 2011).

Além da sensibilização rápida dos receptores TRPV1 pelo NGF, discutidos anteriormente, estudos mostram que há um aumento nos níveis de NGF periférico em alguns modelos de inflamação ou de lesão de nervo (SHINODA et al., 2011; OBATA et al., 2002), com consequente aumento da expressão de receptores TRPV1 (WILSON-GERWING et al., 2008), inclusive em neurônios do gânglio do trigêmeo (SHINODA et al., 2011). Tem sido amplamente demonstrado que este mecanismo contribui para as ações hiperalgésicas do NGF (JI et al., 2002; AMAYA et al., 2004; MALEK et al., 2015). Corroborando estas observações, observamos um aumento dos níveis de NGF do lado ipsilateral à lesão do nervo infraorbital 4 dias após a cirurgia, tempo em que ocorre o pico da hiperalgesia ao calor neste modelo (CHICHORRO et al., 2009). Também no estudo de Kurata et al. (2013), os quais utilizaram um modelo de lesão do ramo maxilar do nervo trigêmeo induzida por movimentação de dente, foram observados níveis aumentados de RNAm para NGF em neurônios dos gânglios do trigêmeo e em células da glia, embora os autores não tenham avaliado a presença de hiperalgesia nos animais. Por outro lado, Costa et al. (2016) não observaram diferença nos níveis de NGF avaliados no nervo trigêmeo ou no plasma de animais submetidos à lesão do nervo infraorbital em comparação com ratos Sham, embora nesse estudo os autores tenham tentado correlacionar os níveis de NGF com o tempo em que foi observada a presença de hiperalgesia mecânica, e não térmica como no nosso estudo. De qualquer forma, o aumento dos níveis de NGF associado ao efeito anti-hiperalgésico do anti-NGF no modelo de lesão do nervo infraorbital no nosso estudo estão de acordo com vários autores que mostraram aumento dos níveis de NGF periférico, em diferentes períodos após a lesão de nervo, bem como sua relação com comportamentos de dor (RAMER et al., 1998; OH et al., 2000; PELESHOK E RIBEIRO-DA-SILVA, 2012).

Interessantemente, o NGF parece não participar do desenvolvimento de hiperalgesia ao frio na região facial, visto que no nosso estudo a administração local do NGF não foi capaz de induzir hiperalgesia ao frio e que a administração de anti-NGF não reduziu a hiperalgesia ao frio induzida pela constrição do nervo infraorbital. Por outro lado, o pico da hiperalgesia ao frio coincidiu com o tempo em que observamos níveis aumentados de NGF no nervo infraorbital dos animais

submetidos à CION. Foi demonstrado em neurônios do DRG que o NGF é capaz de aumentar o grau de variação nas concentrações intracelulares de cálcio induzidas por icilina (KAYANO et al., 2010), um agonista de receptores TRPM8, os quais são importantes sensores de temperatura, podendo ser ativados tanto por frio inócuo quanto por frio nocivo (BAUTISTA et al., 2007), o que sugere que o NGF é capaz de sensibilizar neurônios sensoriais e modular respostas nociceptivas induzidas por frio. Além disso, no estudo de OBATA et al. (2005) foi observado que o bloqueio do NGF pela administração intratecal de anti-NGF, tanto no modelo de inflamação induzido por CFA quanto no modelo de dor neuropática induzida pela lesão do nervo ciático, é capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio, bem como a expressão de receptores TRPA1 nos neurônios do DRG. Além disso, Obata et al. (2005) também observaram que a administração intratecal de NGF aumenta os níveis de TRPA1 via ativação da p38 MAPK. Desta forma, considerando os dados apresentados, podemos sugerir que a participação do NGF no desenvolvimento de hiperalgesia ao frio seja principalmente em nível central, considerando que a administração local/periférica no nosso estudo não modificou o comportamento nociceptivo dos animais. Ao encontro desta hipótese, num modelo dor neuropática trigeminal induzida pela lesão do nervo mentual, os autores não observaram níveis de NGF aumentados na pele do lábio inferior ipsilateral à lesão no tempo em que a hiperalgesia ao frio foi detectada, apenas posteriormente quando esta não estava mais presente (EVANS et al., 2014).

Com relação à hiperalgesia mecânica, os nossos resultados sugerem que o NGF parece não contribuir para o desenvolvimento desta na região facial, pois tanto a administração de NGF a animais naïve quanto a administração de anti-NGF aos animais submetidos à CION (hiperalgésicos) não foi capaz de modificar a responsividade frente à estimulação mecânica da região facial. No estudo de Costa et al. (2016) não foi observada uma associação entre o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica induzida por CION e os níveis de NGF, o que corrobora, pelo menos em parte, o nosso resultado, embora os níveis de NGF não tenham sido avaliados no tempo correspondente ao desenvolvimento de hiperalgesia mecânica.

Por outro lado, vários estudos que utilizaram modelos de dor envolvendo nervos espinhais demonstraram a participação do NGF, tanto através da indução de hiperalgesia mecânica pela administração deste fator (MILLS et al., 2013), quanto pelos estudos que demonstraram que o bloqueio das ações do NGF por anticorpos anti-NGF foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica induzida por mediadores inflamatórios, assim como em modelos de dor neuropática induzida por lesão de nervos, quimioterapia (NAKAHASHI, et al., 2014), câncer (SEVCIK et al., 2005), dentre outros (para revisão ver KHAN e SMITH, 2015). No estudo de QUINTÃO et al. (2008), foi observado que a administração de anticorpo anti-NGF, local, sistêmica ou intratecal, é capaz de atrasar o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica num modelo de dor neuropática induzida pela avulsão do plexo braquial, porém apenas quando o anti-NGF é administrado no momento da cirurgia, não apresentando efeito anti-hiperalgésico quando administrado após o estabelecimento da mesma. Este fato corrobora nossos dados, considerando que no presente estudo o anti-NGF foi administrado no 20º dia após a constrição do nervo infraorbital, quando a hiperalgesia mecânica já atingiu sua intensidade máxima. Além disso, vários autores têm proposto que a hiperalgesia mecânica induzida pelo NGF é decorrente de complexas alterações na via nociceptiva em nível central (LEWIN et al., 1994), o que também poderia explicar a ineficácia do anti-NGF administrado localmente.

Com relação à ineficácia do NGF no presente estudo em induzir hiperalgesia mecânica, é possível que este fator não seja capaz de induzi-la quando administrado por via subcutânea, no lábio superior de ratos, considerando que na maioria dos estudos que observaram o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica induzida pela administração local de NGF na região facial, inclusive em humanos, este foi administrado por via intramuscular, no masseter (SVENSSON et al., 2003; 2008; 2010; WONG et al., 2014). Nesse contexto, estudos têm mostrado que fibras sensoriais que inervam diferentes tecidos podem responder de forma diferente à aplicação de um mesmo estímulo, o qual pode promover sensibilização das fibras num local e ativação ou dessensibilização destas em outro (para revisão ver SESSLE, 2011). Além disso, a projeção das fibras de diferentes tecidos para locais diferentes no núcleo sensorial trigeminal (WANG et

al., 2006) pode influenciar a modulação do estímulo nociceptivo (para revisão ver SESSLE, 2000).

Em conjunto, nossos resultados mostram que o NGF tem um papel pró-nociceptivo no sistema trigeminal, indicando que sua neutralização pode se tornar uma ferramenta farmacológica promissora o controle das dores orofaciais, incluindo as de origem neuropática, visto que uma única administração local de um anticorpo anti-NGF foi capaz de reverter a hiperalgesia ao calor num modelo de dor neuropática trigeminal.

7.2 INFLUÊNCIA DA NT-3 NO PROCESSAMENTO NOCICEPTIVO TRIGEMINAL

Os resultados obtidos neste estudo mostram que, diferentemente do NGF, a administração local de NT-3 não foi capaz de modificar a responsividade de ratos frente à estimulação por calor da região facial. Além disso, foi evidenciado um papel anti-hiperalgésico para esta neurotrofina, a qual foi capaz de prevenir o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor induzida pela administração de NGF, assim como de reduzir a hiperalgesia ao calor induzida por capsaicina em animais naïve, o que sugere o envolvimento dos receptores TrkA e TRPV1 em seu efeito anti-hiperalgésico. Além disso, demonstramos que a administração local de NT-3 é capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor na região facial induzida por CION e que os níveis desta neurotrofina estão consideravelmente aumentados no ramo infraorbital lesionado. Em adição, foi demonstrado que a administração do inibidor de receptores Trk, o K-252a, reduziu discretamente a hiperalgesia ao calor no modelo de dor neuropática trigeminal, mas aboliu o efeito anti-hiperalgésico da NT-3, sugerindo que este efeito da NT-3 é mediado por receptores Trk. Reforçando o papel anti-hiperalgésico desta neurotrofina, também demonstramos que quando doses ineficazes de NT-3 e de anti-NGF são associadas, é possível observar uma redução da hiperalgesia ao calor induzida por CION. Considerando que a administração de NT-3 não modifica a responsividade basal dos animais frente à estimulação térmica por calor da região facial, pode-se sugerir que seus efeitos ficam restritos a modificar estados patológicos, mas não fisiológicos na região facial.

Os resultados deste estudo também sugerem que o efeito anti-hiperalgésico local da NT-3 neste modelo de dor neuropática trigeminal parece ser restrito à hiperalgesia ao calor, considerando que a administração da mesma dose de NT-3 não foi capaz de modificar a hiperalgesia ao frio e a hiperalgesia mecânica na região facial induzida por CION.

Poucos autores avaliaram os efeitos da NT-3 sobre o comportamento nociceptivo de animais desencadeado por estímulos térmicos, sendo a hiperalgesia induzida por estimulação mecânica o foco da maioria dos estudos. Nesse sentido, num modelo de hiperalgesia inflamatória induzida pela administração intraplantar de CFA, a administração local e única de NT-3, no 5º dia após a injeção de CFA, reverteu transitoriamente a hiperalgesia mecânica (WATANABE et al., 2000). Gandhi et al. (2004), utilizando um modelo de hiperalgesia induzida pela administração intramuscular de ácido em camundongos, observaram que a administração local de NT-3, mas não intratecal ou intraperitoneal, reduz a hiperalgesia mecânica nas patas traseiras a partir do 3º dia da aplicação do ácido. Os mesmos autores também mostraram que camundongos que super expressam NT-3 desenvolvem apenas hiperalgesia mecânica transitória, durante 2 ou 3 dias, sugerindo que o aumento da expressão de NT-3 reverte os mecanismos que levam ao desenvolvimento de hiperalgesia crônica nesse modelo (GANDHI et al., 2004). Desta forma, os dados acima demonstram um papel anti-hiperalgésico para a NT-3 quando administrada localmente.

O presente estudo não avaliou o efeito da administração local da NT-3 na hiperalgesia mecânica facial induzida por estímulos inflamatórios ou químicos, mas foi o primeiro estudo, de nosso conhecimento, a demonstrar o efeito antinociceptivo desta neurotrofina na hiperalgesia ao calor induzida em animais naïve pela administração de NGF ou capsaicina na região facial.

O efeito anti-nociceptivo da NT-3 na região facial parece envolver os receptores TrkA, considerando que estes receptores medeiam a hiperalgesia ao calor induzida pela administração de NGF. Em adição, o efeito anti-nociceptivo da NT-3 sobre a hiperalgesia ao calor induzida pela administração de capsaicina e, portanto, mediada por receptores TRPV1, também sugere o envolvimento dos receptores TrkA nas ações da NT-3, considerando que tanto a atividade quanto a

translocação para a membrana dos receptores TRPV1 podem ser moduladas por vias de sinalização intracelulares que se relacionam com os receptores TrkA (ZHANG et al., 2005; WILSON-GERWING et al., 2005). No entanto, em experimentos realizados em neurônios do DRG, Shu e Mendell (1999) mostraram que a NT-3 não é capaz de modificar as correntes induzidas por capsaicina. Desta forma, novos estudos são necessários para identificar os mecanismos envolvidos no efeito anti-hiperalgésico da NT-3.

O estudo de Wilson-Gerwing et al. (2005) mostrou que a infusão intratecal de NT-3 durante 7 dias, desde o momento da cirurgia de constrição do nervo ciático até a avaliação da resposta comportamental, atenuou o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor, mas não modificou a hiperalgesia mecânica, o que corrobora nossos dados. Também no estudo de Ramer et al. (2007), o bloqueio da ação da NT-3 pela infusão contínua de uma proteína de fusão TrkC-Fc por via intratecal não foi efetiva em reduzir a hiperalgesia mecânica ou a hiperalgesia térmica induzidas pela lesão da raiz dorsal (C7/8). Considerando que nesses estudos a NT-3 foi administrada em nível central e que o tratamento foi iniciado antes da hiperalgesia mecânica ter sido estabelecida, a probabilidade de que a ineficácia da NT-3 em reverter a hiperalgesia mecânica no nosso modelo seja decorrente do fato da mesma ter sido administrada local e perifericamente, e após a hiperalgesia mecânica ter sido estabelecida, fica reduzida.

No entanto, não é possível excluir a participação da NT-3 na modulação da resposta nociceptiva desencadeada por estimulação mecânica. Nesse contexto, num modelo de avulsão de plexo braquial em camundongos, a administração (na pata, intraperitonal ou intratecal) de um anticorpo anti-NT-3 foi capaz de atrasar o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica quando administrado no momento da cirurgia, porém não mostrou efeito na reversão desta quando administrado 4 dias após a lesão, sugerindo a participação da NT-3 no desenvolvimento da hiperalgesia, mas não na manutenção desta (QUINTÃO et al., 2008). Também num modelo de dor neuropática induzida por lesão do nervo ciático, a administração intratecal de um oligonucleotídeo NT-3 antisense, durante 14 dias, reduziu a hiperalgesia mecânica a partir do quinto dia de tratamento (WHITE, 2000), demonstrando um papel pró-nociceptivo para a NT-3, o que reforça o resultado anterior desse mesmo autor, no qual foi evidenciado o

desenvolvimento de hiperalgesia mecânica induzida pela administração intratecal de NT-3 a partir do 4^a dia de administração consecutiva (WHITE, 1998). Dados semelhantes foram obtidos por ZHOU et al. (2000), os quais observaram que a administração intraganglionar de anti-NT-3 promove um efeito anti-hiperalgésico na fase tardia da hiperalgesia e que a administração da neurotrofina em animais naïve induz hiperalgesia mecânica. No presente estudo não foi avaliado o efeito da administração local de NT-3 sobre a responsividade de animais não hiperalgésicos frente à estimulação mecânica da região facial, nem o efeito que teria o bloqueio das ações da NT-3 pela administração de um anticorpo na hiperalgesia mecânica induzida pela constrição do nervo infraorbital, o que dificulta a comparação dos nossos resultados com os dados mencionados anteriormente. Avaliando os estudos em conjunto, é possível inferir que a NT-3 tem um papel antinociceptivo na hiperalgesia ao calor induzida por diferentes estímulos e em modelos de dor neuropática. No entanto, com relação a participação da NT-3 na hiperalgesia mecânica, sua atuação fator pró ou anti-hiperalgésico parece depender do modelo de dor, da via de administração e do tempo de tratamento utilizados. Faz-se necessário o desenvolvimento de novos estudos para esclarecer o papel da NT-3 no processamento de diferentes estímulos nociceptivos.

Nesse contexto, Tender et al. (2011), utilizando um modelo de lesão fotoquímica do nervo ciático, observaram no DRG um aumento da expressão de NT-3 e de receptores TrkC principalmente em fibras de pequeno calibre em animais hiperalgésicos, enquanto que em animais que não desenvolveram hiperalgesia a expressão de ambos ficou quase exclusivamente restrita às fibras de médio e grande calibre, de forma semelhante ao observado em animais do grupo controle. Se extrapolarmos os dados de Tender et al. (2011) para o nosso modelo, é possível sugerir que o aumento observado nos níveis de NT-3 nos ramos infraorbitais dos animais submetidos à constrição infraorbital e que desenvolveram hiperalgesia ao calor seja um mecanismo compensatório, desencadeado para tentar controlar a resposta hiperalgésica. Além disso, a alteração no padrão de expressão dos receptores TrkC para as fibras de pequeno calibre torna possível sugerir que a NT-3 exógena esteja atuando preferencialmente em fibras nociceptivas de pequeno calibre, tanto em receptores

TrkC que passaram a ser expressos, como em receptores TrkA, para exercer seu efeito antinociceptivo. Corrobora essa hipótese o fato da administração do inibidor não-seletivo de receptores Trk (K-252a) ter reduzido, embora discretamente, a hiperalgesia ao calor induzida por CION quando administrado isoladamente, e ter bloqueado o efeito antinociceptivo da NT-3 exógena em animais submetidos à CION quando administrado previamente a esta neurotrofina, o que reduziria tanto o efeito pró-hiperalgésico do NGF quanto inibiria o efeito anti-hiperalgésico da NT-3, ambos via TrkA, nesse modelo. Em adição, o efeito anti-hiperalgésico observado em animais submetidos à CION quando doses ineficazes de NT-3 e anti-NGF foram associadas reforça a hipótese de que a NT-3 esteja atuando em receptores TrkA, considerando que sua ligação a estes receptores seria facilitada pelo sequestro de parte do NGF decorrente da administração do anticorpo. No entanto, não é possível desconsiderar que os receptores TrkC tenham um papel relevante no efeito anti-hiperalgésico da NT-3, especialmente considerando que o K-252a inibe todos os receptores Trk. Outros estudos também observaram uma associação entre o aumento da expressão de NT-3, em nível periférico (SHARMA et al., 2010; TU et al., 2015) ou central (MI et al., 2011), e o desenvolvimento de hiperalgesia. No modelo de dor neuropática trigeminal utilizado nesse estudo foram detectados níveis significativamente aumentados de NT-3 no ramo infraorbital lesionado, no período em que ocorre a resposta hiperalgésica máxima, tanto pela estimulação da região facial por calor quanto por frio (CHICHORRO et al., 2006b; 2009), o que reforça a possibilidade de existir uma associação entre a expressão de NT-3 e a resposta nociceptiva. No entanto, a administração da NT-3 foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor, mas não ao frio induzida nos animais submetidos à CION. Dessa forma, é possível sugerir que a ineficácia da NT-3 exógena em reduzir a hiperalgesia ao frio no presente estudo seja decorrente do fato da mesma não participar do processamento nociceptivo deste estímulo no sistema trigeminal, ou ainda que o aumento desta neurotrofina esteja contribuindo para a manutenção da hiperalgesia frente a este estímulo. Até o momento, não foram encontradas informações dados sobre a participação da NT-3 no processamento do frio nocivo por nervos espinhais.

Apesar da NT-3 não ter sido efetiva em reduzir a hiperalgesia ao frio e a hiperalgesia mecânica no nosso estudo, o efeito anti-hiperalgésico promovido

pela NT-3 em animais submetidos à estimulação por calor da região facial, tanto no modelo de dor neuropática trigeminal quanto na hiperalgesia induzida pela administração de NGF e capsaicina em animais naïve, sugere que no sistema sensorial trigeminal a NT-3 desempenha um papel anti-nociceptivo. Desta forma, é possível que a NT-3 seja efetiva no controle das dores orofaciais, incluindo a neuralgia do trigêmeo.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que os fatores neurotróficos, fator de crescimento do nervo (NGF) e NT-3, participam de forma antagônica no processamento nociceptivo trigeminal. O NGF apresentou um efeito pró-hiperalgésico enquanto a NT-3 mostrou um papel anti-hiperalgésico. Além disso, foi evidenciado que tanto a neutralização do NGF quanto a administração da NT-3 foram eficazes em reduzir a hiperalgesia térmica ao calor num modelo de dor neuropática trigeminal.

Com relação ao envolvimento do NGF no processamento de estímulos nociceptivos aplicados na região facial é possível concluir que:

- A administração local de NGF promoveu o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor na região facial de ratos naïve, a qual foi mediada por receptores TrkA e parece envolver a participação de receptores TRPV1 e de mastócitos locais;
- A neutralização local do NGF pela administração de um anticorpo anti-NGF reverteu a hiperalgesia ao calor na região facial induzida pela constrição do nervo infraorbital;
- A constrição do nervo infraorbital promoveu aumento dos níveis de NGF no nervo lesionado;
- A administração local de NGF não influenciou a resposta de animais naïve frente à estimulação por frio da região facial;
- A neutralização local do NGF pela administração de um anticorpo anti-NGF não foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio induzida pela constrição do nervo infraorbital;
- A administração local de NGF não influenciou a resposta de animais naïve frente à estimulação mecânica da região facial;
- A neutralização local do NGF pela administração de um anticorpo anti-NGF não foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica induzida pela constrição do nervo infraorbital.

Com relação ao envolvimento da NT-3 no processamento de estímulos nociceptivos aplicados na região facial é possível concluir que:

- A administração local de NT-3 não influenciou a resposta de animais naïve frente à estimulação por calor da região facial;
- A administração local de NT-3 preveniu o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor induzida na região facial pela administração local de NGF e reduziu a hiperalgesia ao calor induzida pela administração de capsaicina;
- A administração local de NT-3 reduziu o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital;
- A constrição do nervo infraorbital promoveu aumento dos níveis de NT-3 no nervo lesionado;
- A administração de um inibidor de receptores Trk atenuou a hiperalgesia ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital e bloqueou o efeito anti-hiperalgésico da NT-3 nesse modelo, sugerindo que estes receptores medeiam o efeito anti-hiperalgésico da NT-3;
- A associação de doses ineficazes de NT-3 e anti-NGF reduziu a hiperalgesia ao calor induzida na região facial pela constrição do nervo infraorbital;
- A administração local de NT-3 não foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio e a hiperalgesia mecânica induzidas pela constrição do nervo infraorbital.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi demonstrado que os fatores neurotróficos, NGF e NT-3, atuam de forma antagônica no processamento de estímulos nociceptivos conferido pelo sistema trigeminal. O NGF atua como um fator pró-hiperalgésico enquanto a NT-3 mostrou ter um papel anti-hiperalgésico.

O bloqueio das ações do NGF para o controle de dores crônicas tem sido extensivamente estudado. Várias moléculas capazes de neutralizar este fator estão sendo desenvolvidas e avaliadas em estudos pré-clínicos e clínicos. Esses anticorpos tem se mostrado eficazes principalmente no controle da dor associada à osteoartrite. Porém, os efeitos adversos associados ao tratamento, os quais incluem artralgia, dor nas extremidades, parestesia e edema periférico, limitam seu uso em alguns indivíduos. No entanto, o perfil de segurança dessa molécula se mostra favorável à continuidade do seu desenvolvimento. (KELLEHER et al., 2016)

Com relação à NT-3, apesar da sua segurança ter sido estabelecida em indivíduos saudáveis (CHAUDHRY et al., 2000), um estudo clínico de fase I conduzido em indivíduos com neuropatia periférica induzida por diabetes ou por quimioterapia foi descontinuado e as razões para esta conduta não foram divulgadas (LEINNINGER et al., 2004).

A participação das neurotrofinas em complexos processos fisiológicos, os quais são essenciais para o funcionamento adequado do sistema nervoso central e periférico, dificulta uma modulação segura das suas ações quando os mesmos estão envolvidos em processos patológicos, como no caso das dores crônicas. A possibilidade de modificar localmente as ações das neurotrofinas para promover o efeito desejado pode favorecer o perfil de risco e benefício do tratamento. Nesse contexto, a principal contribuição do presente estudo foi demonstrar que o tratamento local com um anticorpo anti-NGF ou com NT-3 foi capaz de modificar a hiperalgesia ao calor associada ao um modelo de dor neuropática trigeminal.

Desta forma, a neutralização local do NGF e o favorecimento das ações da NT-3 podem representar ferramentas farmacológicas potenciais para o controle das dores na região orofacial, incluindo as de origem neuropática.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, V. R.; LOVELL, K.; PETERS, S.; JAVIDI, H.; JOUGHIN, A.; GOLDTHORPE J. Psychosocial interventions for the management of chronic orofacial pain. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 9, n. 11, p. CD008456, 2011.

AIRAKSINEN, M. S.; KOLTZENBURG, M.; LEWIN, G. R.; MASU, Y.; HELBIG, C.; WOLF, E.; BREM, G.; TOYKA, K. V.; THOENEN, H.; MEYER, M. Specific subtypes of cutaneous mechanoreceptors require neurotrophin-3 following peripheral target innervation. **Neuron.**, v. 16, p. 287-295, 1996.

ALOE, L; ROCCO, M. L.; BIANCHI, P; MANNI, L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. **J Transl Med.**, v. 29, n. 10, p. 239, 2012.

AL-QULITI, K. W. Update on neuropathic pain treatment for trigeminal neuralgia. The pharmacological and surgical options. **Neurosciences (Riyadh).**, v. 20, n. 2, p. 107-114, 2015.

AMANN, R.; SCHULIGOI, R.; HERZEG, G.; DONNERER, J. Intraplantar injection of nerve growth factor into the rat hind paw: local edema and effects on thermal nociceptive threshold. **Pain**, v. 64, p. 323-329, 1995.

AMAYA, F; SHIMOSATO, G; NAGANO, M; UEDA, M; HASHIMOTO, S; TANAKA, Y; SUZUKI, H; ANDERSON, L. C., VAKOULA, A., VEINOTE, R. Inflammatory hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Arch Oral Biol**, v. 48, p. 161-169, 2003.

ANDRADE, E. L.; LUIZ, A. P.; FERREIRA, J.; CALIXTO J. B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, v. 152, p. 511-520, 2008.

ARNOLD, L. M.; CLAUW, D. J.; DUNEGAN, L. J.; TURK, D. C.; FibroCollaborative. A framework for fibromyalgia management for primary care providers. **Mayo Clin Proc.**, v. 87, n. 5, p. 488-496, 2012.

BANNWARTH, B.; KOSTINE, M. Targeting nerve growth factor (NGF) for pain management: what does the future hold for NGF antagonists? **Drugs.**, v. 74, n. 6, p. 619-626, 2014.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **Lancet Neurol.**, v. 9, n. 8, p. 807-819, 2010.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J; GLAZER, J. M.; TSURUDA, P. R.; BASBAUM, A. I.; STUCKY, C. L.; JORDT, S. E.; JULIUS, D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature.**, v. 12; n. 448, p. 204-208, 2007.

BENEDETTI, M.; LEVI, A.; CHAO, M. V. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 16, p. 7859-7863, 1993.

BENNETT, G.; AL-RASHED, S.; HOULT, J. R.; BRAIN, S. D. Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulating neutrophils. **Pain**, v. 77, n. 3, p. 315-322, 1998.

BENOLIEL, R.; SHARAV, Y. Chronic orofacial pain. **Curr Pain Headache Rep**, v. 14, n. 1, p. 33-40, 2001.

BEREITER, D. A.; BEREITER, D. F. Morphine and NMDA receptor antagonism reduce c-fos expression in spinal trigeminal nucleus produced by acute injury to the TMJ region. **Pain**, v. 85, n. 1-2, p. 65-77, 2000.

BERGMANN, I.; REITER, R.; TOYKA, K. V.; KOLTZENBURG, M. Nerve growth factor evokes hyperalgesia in mice lacking the low-affinity neurotrophin receptor p75. **Neurosci Lett**, v. 255, n. 2, p. 87-90, 1998.

BERNARD-GAUTHIER, V.; SCHIRRMACHER, R. Evaluation of WO2015042088 A1 - a novel urea-based scaffold for TrkA inhibition. **Expert Opin Ther Pat**, v. 26, n. 2, p. 291-295, 2016.

BONNINGTON, J. K.; McNAUGHTON, P. A. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. **J Physiol**, v. 551, p. 433-446, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHAI, B.; GUO, W.; WEI, F.; DUBNER, R.; REN, K. Trigeminal-rostral ventromedial medulla circuitry is involved in orofacial hyperalgesia contralateral to tissue injury. **Mol Pain**, v. 8, p. 78, 2012.

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 4, p. 299-309, 2003.

CHATTERJEA, D.; MARTINOV, T. Mast cells: versatile gatekeepers of pain. **Mol Immunol**, v. 63, n. 1, p. 38-44, 2015.

CHAUDHRY, V.; GIULIANI, M.; PETTY, B. G.; LEE, D.; SEYEDSADR, M.; HILT, D.; CORNBLATH, D. R. Tolerability of recombinant-methionyl human neurotrophin-3 (r-metHuNT3) in healthy subjects. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 2, p. 189-192, 2000.

CHEBBI, R.; BOYER, N.; MONCONDUIT, L.; ARTOLA, A.; LUCCARINI, P.; DALLEL, R. The nucleus raphe magnus OFF-cells are involved in diffuse noxious inhibitory controls. **Exp Neurol**, v. 256, p. 39-45, 2014.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. P.; RAE, G. A. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: Reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Pain**, v. 123, v. 64-74, 2006a.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; CABRINI, D. A.; FRANCO, C. R. C.; RAE, G. A. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**, v. 43, p. 133-142, 2009.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ETB Receptor Antagonist Reduces Mechanical Allodynia in Rats with Trigeminal Neuropathic Pain. **Exp Biol Med**, v. 231, p. 1136-1140, 2006b.

CHILDS, A. M.; MEANEY, J. F.; FERRIE, C. D.; HOLLAND, P. C. Neurovascular compression of the trigeminal and glossopharyngeal nerve: three case reports. **Arch Dis Child**. v. 82, n. 4, p. 311-315, 2000.

CHUANG, H. H.; PRESCOTT, E. D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S. E.; BASBAUM, A. I.; CHAO, M. V.; CIRILLO, G.; CAVALIERE, C.; BIANCO, M. R.; SIMONE, A. D.; COLANGELO, A. M.; SELLITTI, S.; ALBERGHINA, L.; PAPA, M. Intrathecal NGF administration reduces reactive astrogliosis and changes neurotrophin receptors expression pattern in a rat model of neuropathic pain. **Cell Mol Neurobiol**, v. 30, p. 51-62, 2010.

CHUANG, H. H.; PRESCOTT, E. D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S. E.; BASBAUM, A. I.; CHAO, M. V.; JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**. v. 411, n. 6840, p. 957-962, 2001.

CIRILLO, G.; CAVALIERE, C.; BIANCO, M. R.; DE SIMONE, A.; COLANGELO, A. M.; SELLITTI, S.; ALBERGHINA, L.; PAPA, M. Intrathecal NGF administration reduces reactive astrogliosis and changes neurotrophin receptors expression pattern in a rat model of neuropathic pain. **Cell Mol Neurobiol**. v. 30, n. 1, p. 51-62, 2010.

CLARY, D. O.; REICHARDT, L. F. An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 23, p. 11133-11137, 1994.

COELHO, S. C.; BASTOS-PEREIRA, A. L.; FRAGA, D.; CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R. Etanercept reduces thermal and mechanical orofacial hyperalgesia following inflammation and neuropathic injury. **Eur J Pain**. v. 18, n. 7, p. 957-967, 2014.

COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGUER, V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 40, n. 10, p. 1014-1018, 1954.

COHEN, S. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 46, n. 3, p. 302-311, 1960.

COLAFRANCESCO, V.; VILLOSLADA, P. Targeting NGF pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases. **Arch Ital Biol**. v. 149, n. 2, p. 183-192, 2011.

COPRAY, J. C.; BROUWER, N. Selective expression of neurotrophin-3 messenger RNA in muscle spindles of the rat. **Neuroscience**, v. 63, p. 1125-1135, 1994.

COSTA, G. M. F.; DE OLIVEIRA, A. P.; MARTINELLI, P. M.; DA SILVA CAMARGOS, E. R.; ARANTES, R. M. E.; DE ALMEIDA-LEITE, C. M. Demyelination/remyelination and expression of interleukin-1 β , substance P, nerve growth factor, and glial-derived neurotrophic factor during trigeminal neuropathic pain in rats. **Neurosci Lett** v. 612, p. 210–218, 2016.

CRAIG, A. D. Jr.; BURTON, H. Spinal and medullary lamina I projection to nucleus submedialis in medial thalamus: a possible pain center. **J Neurophysiol.** v. 45, n. 3, p. 443-466, 1981.

CROWLEY, C.; SPENCER, S. D.; NISHIMURA, M. C.; CHEN, K. S.; PITTS-MEEK, S.; ARMANINI, M. P.; LING, L. H.; McMAHON, S. B.; SHELTON, D. L.; LEVINSON, A. D.; PHILIPS, H. S. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet development basal forebrain cholinergic neurons. **Cell**, v. 76, p. 1001-1011, 1994.

CRUZ, L. S.; KOPRUSZINSKI, C. M.; CHICHORRO, J. G. Intraganglionic resiniferatoxin prevents orofacial inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Behav Pharmacol.** v. 25, n. 2, p. 112-118, 2014.

CUELLAR, J. M.; MANERING, N. A.; KLUKINOV, M.; NEMENOV, M. I.; YEOMANS, D. C. Thermal nociceptive properties of trigeminal afferent neurons in rats. **Molecular Pain**, v. 6, p. 39, 2010.

DALLEL, R.; RABOISSON, P.; AUROY, P.; WODA, A. The rostral part of the trigeminal sensory complex is involved in orofacial nociception. **Brain Res.** v. 228, n. 1, p. 7-19, 1988.

DALLEL, R.; VILLANUEVA, L.; WODA, A.; VOISIN, D. [Neurobiology of trigeminal pain]. **Med Sci (Paris)**. v. 19, n. 5, p. 567-574, 2003.

DA SILVA, A. F.; DOS SANTOS, M. F. The role of sensory fiber demography in trigeminal and postherpetic neuralgias. **J Dent Res.** v. 91, n. 1, p. 17-24, 2012.

DAVIES, S.; LOESCHER, A. R.; CLAYTON, N. M.; BOUNTRA, C.; ROBINSON, P. P.; BOISSONADE, F. M. Changes in sodium channel expression following trigeminal nerve injury. **Experimental Neurology**, v. 202, p. 207–216, 2006.

DAVIS, G.; CURTIN, C. M. Management of Pain in Complex Nerve Injuries. **Hand Clin.** v. 32, n. 2, p. 257-262, 2016.

DE ROSSI, S. S. Orofacial pain: a primer. **Dent Clin North Am.** v. 57, n. 3, p. 383-392, 2013.

DENG, Y. S.; ZHONG, J. H.; ZHOU, X. F. Effects of endogenous neurotrophins on sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia and allodynia following spinal nerve injury. **Experimental Neurology**, v. 164, p. 344-350, 2000.

DEVOR, M.; AMIR, R.; RAPPAPORT, Z. H. Pathophysiology of trigeminal neuralgia: the ignition hypothesis. **Clin J Pain**. v. 18, n. 1, p. 4-13, 2002a.

DEVOR, M.; GOVRIN-LIPPMANN, R.; RAPPAPORT, Z. H. Mechanism of trigeminal neuralgia: a ultrastructural analysis of trigeminal root specimens obtained during microvascular decompression surgery. **J Neurosurg**. v. 96, n. 3, p. 532-543, 2002b.

DIOGENES, A.; AKOPIAN, A. N.; HARGREAVES, K. M. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. **J Dent Res**. v. 86, n. 6, p. 550-555, 2007.

DJOUHRI, L. PG110, A Humanized Anti-NGF Antibody, Reverses Established Pain Hypersensitivity in Persistent Inflammatory Pain, but not Peripheral Neuropathic Pain, Rat Models. **Pain Med**. [Epub ahead of print], 2016

DONNERER, J.; SCHULIGOI, R.; AMANN, R. Time-course of capsaicin-evoked release of calcitonin gene-related peptide from rat spinal cord in vitro. Effect of concentration and modulation by Ruthenium Red. **Regul Pept**. v. 37, n. 1, p. 27-37, 1992.

DOS REIS, R. C.; KOPRUSZINSKI, C. M.; NONES, C. F. CHICHORRO, J. G. Nerve growth factor induces facial heat hyperalgesia and plays a role in trigeminal neuropathic pain in rats. **Behav Pharmacol**. v. 27, n. 6, p. 528-535, 2016.

DYCK, P. J.; PEROUTKA, S.; RASK, C.; BURTON, E.; BAKER, M. K.; LEHMAN, K. A.; GILLEN, D. A.; HOKANSON, J. L.; OBRIEN, P. C. Intradermal recombinant human nerve growth factor induces pressure allodynia and lowered heat-pain threshold in humans. **Neurology**, v. 48, p. 501-505, 1997.

EL-TALLAWY, H. N.; FARGHALYA, W. M.; RAGEHA, T. A.; SHEHATTA, G. A.; HAKEEM, N. A.; BADRY, R.; KANDIL, M. R. Prevalence of trigeminal neuralgia in Al-Quseir city (Red sea Governorate), Egypt. **Clin Neuroland Neurosurg**. p. 1-3, 2013.

ERNFORS, P.; LEE, K. F.; KUCERA, J.; JAENISCH, R. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. **Cell**, v. 77, p. 503-512, 1994.

ERZURUMLU, R. S.; MURAKAMI, Y.; RIJLI, F. M. Mapping the face in the somatosensory brainstem. **Nature**, v. 11, p. 252-263, 2010.

EVANS, L. J.; LOESCHER, A. R.; BOISSONADE, F. M.; WHAWELL, S. A.; ROBINSON, P. P.; ANDREW, D. Temporal mismatch between pain behaviour, skin Nerve Growth factor and intra-epidermal nerve fibre density in trigeminal neuropathic pain. **BMC Neurosci**. v. 15, p. 1, .2014.

FARINAS, I.; JONES, K. R.; BACKUS, C.; WANG, X. Y.; REICHARDT, L. F. Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. **Nature**, v. 369, p. 658-661, 1994.

FAYARD, E.; TINTIGNAC, L. A.; BAUDRY, A.; HEMMINGS, B. A. Protein kinase B/Akt at a glance. **J Cell Sci**. v. 118, p. 5675-5678, 2005.

FEIL, K.; HERBERT, H. Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei. **J Comp Neurol**. v. 353, n. 4, p. 506-528, 1995.

FINNERUP, N. B.; HAROUTOUNIAN, S.; KAMERMAN, P.; BARON, R.; BENNETT, D. L.; BOUHASSIRA, D.; CRUCCU, G.; FREEMAN, R.; HANSSON, P.; NURMIKKO, T.; RAJA, S. N.; RICE, A. S.; SERRA, J.; SMITH, B. H.; TREEDE, R. D.; JENSEN, T. S. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. **Pain**. v. 157, n. 8, p. 1599-1606, 2016.

FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 21, n. 2, p. 129-136, 2007.

FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J. The mast cell-nerve functional unit: a key component of physiologic and pathophysiologic responses. **Chem Immunol Allergy**. v. 98, p. 196-221, 2012.

GAVVA, N. R.; TAMIR, R.; KLIONSKY, L.; NORMAN, M. H.; LOUIS, J. C.; WILD, K. D.; TREANOR, J. J. Proton activation does not alter antagonist interaction with the capsaicin-binding pocket of TRPV1. **Mol Pharmacol**. v. 68, n. 6, p. 154-133, 2005.

GENÇ, B.; ULUPINAR, E.; ERZURUMLU, R. S. Differential Trk expression. In explant and dissociated trigeminal ganglion cell cultures. **J Neurobiol**, v. 64, n. 2, p. 145-156, 2005.

GOBEL, S.; FALLS, W. M.; HUMPHREY, E. Morphology and synaptic connections of ultrafine primary axons in lamina I of the spinal dorsal horn: candidates for the terminal axonal arbors of primary neurons with unmyelinated (C) axons. **J Neurosci**. v. 1, n. 10, p. 1163-1179, 1981.

GANDHI, R.; RYALS, J. M.; WRIGHT, D. E. Neurotrophin-3 reverses chronic mechanical hyperalgesia induced by intramuscular acid injection. **J Neurosci**. v. 24, n. 42, p. 9405-9413, 2004.

GOULD, H. J. 3rd; GOULD, T. N.; ENGLAND, J. D.; PAUL, D.; LIU, Z. P.; LEVINSON, S. R. A possible role for nerve growth factor in the augmentation of sodium channels in models of chronic pain. **Brain Res**, v. 854, p. 19-29, 2000.

HALL, G. C.; CARROLL, D.; McQUAY, H. J. Primary care incidence and treatment of four neuropathic pain conditions: a descriptive study, 2002-2005. **BMC Fam Pract**. v. 9, p. 26, 2008.

HALPERN, L.; WILLIS, P. Orofacial Pain: Pharmacologic Paradigms for Therapeutic Intervention. **Dent Clin North Am**. v. 60, n. 2, p. 381-405, 2016.

HAMLYN, P. J.; KING, T. T. Neurovascular compression in trigeminal neuralgia: a clinical and anatomical study. **J Neurosurg**. v. 76, n. 6, p. 948-954, 1992.

HARGREAVES, K. M. Orofacial pain. **Pain**. v. 152, p. 25-32, 2011.

HASHINOMOTO, Y.; NAKAYAMA, T.; TERAMOTO, T.; KATO, H.; WATANABE, T.; KINOSHITA, M.; TSUKAMOTO, K.; TOKUNAGA, K.;

KUROKAWA, K.; NAKANISHI, S.; et al. Potent and preferential inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II by K252a and its derivative, KT5926. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 181, n. 1, p. 423-429, 1991.

Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). **Cephalalgia.** v. 33, n. 9, p. 629-808, 2013.

HEFTI, F. F.; ROSENTHAL, A.; WALICKE, P. A.; WYATT, S.; VERGARA, G.; CHELTON, D. L.; DAVIES, A. M. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. **Trends Pharmacol Sci,** v. 27, p. 85-91, 2006.

HILTON, D. A.; LOVE, S.; GRADIDGE, T.; COAKHAM, H. B. Pathological findings associated with trigeminal neuralgia caused by vascular compression. **Neurosurgery.** v. 35, n. 2, p. 299-303, 1994.

HOLMES, D. Anti-NGF painkillers back on track? **Nature,** v. 11, p. 337-338, 2012.

HUANG, E. J.; WILKINSON, G. A.; FARIÑAS, I.; BACKUS, C.; ZANG, K.; WONG, S. L.; REICHARDT, L. F. Expression of Trk receptors in the developing mouse trigeminal ganglion: in vivo evidence for NT-3 activation of TrkA and TrkB in addition to TrkC. **Development,** v. 126, n. 10, p. 2191-2203, 1999.

HUDMON, A.; CHOI, J. S.; TYRRELL, L.; BLACK, J. A.; RUSH, A.M.; WAXMAN, S. G.; DIB-HAJJ, S. D. Phosphorylation of sodium channel (Na)_v1.8 by p38 mitogen-activated protein kinase increases current density in dorsal root ganglion neurons. **J Neurosci,** v. 28, p. 3190-3201, 2008.

IMAMURA, Y.; KAWAMOTO, H.; NAKANISHI, O. Characterization of heat hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. **Exp Brain Res,** v. 116, p. 97-103, 1997.

IWATA, K.; IMAMURA, Y.; HONDA, K.; SHINODA, M. Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. **Int Rev Neurobiol.** v. 97, p. 227-250, 2011.

JACOBS, J. S.; MILLER, M. W. Expression of nerve growth factor, p75, and the high affinity neurotrophin receptors in the adult rat trigeminal system: evidence for multiple trophic support systems. **J Neurocytol,** v. 28, n. 7, p. 571-595, 1999.

JACQUIN, M. F.; CHIAIA, N. L.; RHOADES, R. W. Trigeminal projections to contralateral dorsal horn: central extent, peripheral origins, and plasticity. **Somatosens Mot Res,** v. 7, n. 2, p. 153-183, 1990.

JANETTA, P.J. Arterial compression of the trigeminal nerve at the pons in patients with trigeminal neuralgia. **J Neurosurg.** 1967;26(1):Suppl:159-62.

JI RR, SAMAD TA, JIN SX, SCHMOLL R, WOOLF CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron.** 2002 Sep 26;36(1):57-68.

JULIUS, D; BASBAUM, AI. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** 2001 Sep13;413(6852):203-10. Review.

JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**. 2001 Jun 21;411(6840):957-62.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 2013;29:355-84.

KANAI, Y; HARA, T; IMAI, A; SAKAKIBARA, A. Differential involvement of TRPV1 receptors at the central and peripheral nerves in CFA-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **J Pharm Pharmacol**. 59:733–8. 2007.

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Curr Opin Neurobiol**, v. 10, p. 381-391, 2000.

KATUSIC, S.; WILLIAMS, D. B.; BEARD, C. M.; BERGSTRALH, E. J.; KURLAND L. T. Epidemiology and clinical features of idiopathic trigeminal neuralgia and glossopharyngeal neuralgia: similarities and differences, Rochester, Minnesota, 1945-1984. **Neuroepidemiol**, v. 10, n. 5-6, p. 276-81, 1991.

KAYANO, T; KITAMURA, N; MORIYA, T; TSUTSUMI, A; OZAKI, Y; DAYANITHI, G; SHIBUYA, I. Chronic treatment with NGF induces spontaneous fluctuations of intracellular Ca(2+) in icilin-sensitive dorsal root ganglion neurons of the rat. **J Vet Med Sci**. 2010 Dec;72(12):1531-8.

KELLEHER, JH; TEWARI, D; McMAHON, SB. Neurotrophic factors and their inhibitors in chronic pain treatment. **Neurobiol Dis**. 2016 Apr 7. pii: S0969-9961(16)30071-7.

KERR, F. W. Evidence for a peripheral etiology of trigeminal neuralgia. **J. Neurosurg**, v. 26, n. 1, p. 168-74, 1967.

KHAN N, SMITH MT. Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology. **Molecules**. 2015 Jun 9;20(6):10657-88. doi: 10.3390/molecules200610657. Review. PubMed PMID: 26065639.

KHODOROVA A, NICOL GD, STRICHARTZ G. The p75NTR signaling cascade mediates mechanical hyperalgesia induced by nerve growth factor injected into the rat hind paw. **Neuroscience**. 2013 Dec 19;254:312-23.

KHODOROVA A, NICOL GD, STRICHARTZ G. The TrkA receptor mediates experimental thermal hyperalgesia produced by nerve growth factor: Modulation by the p75 neurotrophin receptor. **Neuroscience**. 2017 Jan 6;340:384-397. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.10.064.

KITT, CA; GRUBER, K; DAVIS, M; WOOLF, CJ; LEVINE, JD. Trigeminal neuralgia: opportunities for research and treatment. **Pain**. 2000 Mar;85(1-2):3-7. Review.

KLEEF, MV; GENDEREN, WEV; NAROUZE, S; NURMIKKO, TJ; ZUNDERT, JV; GEURTS, JW; *et al*. Trigeminal Neuralgia. World Institute of Pain. **Pain Pract**. 2009;9(4):252-59.

KLEIN, R.; SILOS-SANTIAGO, I.; SMEYNE, R.J.; LIRA, S.A.; BRAMBILLA, R.; BRYANT, S.; ZHANG, L.; SNIDER, W.D.; BARBACID, M. Disruption of the

neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates muscle afferents and results in abnormal movements. **Nature**, v. 368, p. 249-251, 1994.

KNIGHT, E Jr; CONNORS, TJ; MARONEY, AC; ANGELES, TS; HUDKINS, RL; DIONNE, CA. A radioactive binding assay for inhibitors of *trkA* kinase. **Anal Biochem**. 1997 May 1;247(2):376-81.

KOOPMAN, JS; DIELEMAN, JP; HUYGEN, FJ; DE MOS, M; MARTIN, CG; STURKENBOOM, MC. Incidence of facial pain in the general population. **Pain**. 2009 Dec 15;147(1-3):122-7. doi: 10.1016/j.pain.2009.08.023. Epub 2009 Sep 26. PubMed PMID: 19783099.

KURATA, S; GOTO, T; K GUNJIGAKE, K; KATAOKA, S; N KUROISHI, K; ONO, K; TOYONO, T; KOBAYASHI, S; YAMAGUCHI, K. Nerve Growth Factor Involves Mutual Interaction between Neurons and Satellite Glial Cells in the Rat Trigeminal Ganglion. **Acta Histochem Cytochem**. 2013 Apr 30;46(2):65-73.

LAWSON, SN; MCCARTHY, PW; PRABHAKAR, E. Electrophysiological properties of neurones with CGRP-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia. **J Comp Neurol**. 1996 Feb 12;365(3):355-66.

LAZAROV, NE. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. **Prog Neurobiol**. 2002 Jan;66(1):19-59. Review. PubMed PMID: 11897404.

LEINNINGER GM, VINCENT AM, FELDMAN EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. **J Peripher Nerv Syst**. 2004 Mar;9(1):26-53. Review. PubMed PMID: 14871451.

LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. **Science**. 1987 Sep 4;237(4819):1154-62. Review. PubMed PMID: 3306916.

LEWIN, GR; RITTER, AM; MENDELL, LM. Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. **J Neurosci**. 1993 May;13(5):2136-48. PubMed PMID: 8478693.

LEWIN, GR; RUEFF, A; MENDELL, LM. Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. **Eur J Neurosci**. 1994 Dec 1;6(12):1903-12. PubMed PMID: 7704300.

LEWIN, G. R. et al. Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. **J Neurosci**, v. 13, p. 2136-2148, 1993.

LIPTON JA, SHIP JA, LARACH-ROBINSON D. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. **J Am Dent Assoc**. 1993 Oct;124(10):115-21. PubMed PMID: 8409001.

LOVE S, COAKHAM HB. Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis. **Brain**. 2001;124(Pt 12):2347-60.

LUIZ AP, SCHROEDER SD, CHICHORRO JG, CALIXTO JB, ZAMPRONIO AR, RAE GA. Kinin B(1) and B(2) receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats. **Neuropeptides**. 2010 Apr;44(2):87-92.

LUIZ AP, SCHROEDER SD, CHICHORRO JG, CALIXTO JB, ZAMPRONIO AR, RAE GA. Kinin B(1) and B(2) receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats. **Neuropeptides**. 2010 Apr;44(2):87-92.

MA, Q. P.; WOOLF, C. J. The progressive tactile hyperalgesia induced by peripheral inflammation is nerve growth factor dependent. **Neuroreport**, v. 8, p. 807-810, 1997.

MALCANGIO M, BOWERY NG. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends Pharmacol Sci**. 1996 Dec;17(12):457-62. Review.

MALCANGIO M, GARRETT NE, CRUWYS S, TOMLINSON DR. Nerve growth factor- and neurotrophin-3-induced changes in nociceptive threshold and the release of substance P from the rat isolated spinal cord. **J Neurosci**. 1997 Nov 1;17(21):8459-67.

MALCANGIO M, RAMER MS, BOUCHER TJ, MCMAHON SB. Intrathecally injected neurotrophins and the release of substance P from the rat isolated spinal cord. **Eur J Neurosci**. 2000 Jan;12(1):139-44.

MALEK N, PAJAK A, KOLOSOWSKA N, KUCHARCZYK M, STAROWICZ K. The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. **Mol Cell Neurosci**. 2015 Mar;65:1-10.

MARBACH JJ. Medically unexplained chronic orofacial pain. Temporomandibular pain and dysfunction syndrome, orofacial phantom pain, burning mouth syndrome, and trigeminal neuralgia. **Med Clin North Am**. 1999 May;83(3):691-710, vi-vii. Review.

MASOUDI R, IOANNOU MS, COUGHLIN MD, PAGADALA P, NEET KE, CLEWES O, ALLEN SJ, DAWBARN D, FAHNESTOCK M. Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. **J Biol Chem**. 2009 Jul 3;284(27):18424-33.

MATSUURA Y, IWAKURA N, OHTORI S, SUZUKI T, KUNIYOSHI K, MURAKAMI K, HIWATARI R, HASHIMOTO K, OKAMOTO S, SHIBAYAMA M, KOBAYASHI T, OGAWA Y, SUKEGAWA K, TAKAHASHI K. The effect of Anti-NGF receptor (p75 Neurotrophin Receptor) antibodies on nociceptive behavior and activation of spinal microglia in the rat brachial plexus avulsion model. **Spine (Phila Pa 1976)**. 2013 Mar 15;38(6):E332-8.

MCMAHON SB, BENNETT DL, PRIESTLEY JV, SHELTON DL. The biological effects of endogenous nerve growth factor on adult sensory neurons revealed by a trkA-IgG fusion molecule. **Nat Med**. 1995 Aug;1(8):774-80.

MCMAHON, S. B.; ARMANINI, M. P.; LING, L. H.; PHILLIPS, H. S. Expression and coexpression of Trk receptors in sub-populations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. **Neuron**, v.12, p.1161-1171, 1994.

MENDELL, L.; ALBERS, K. M.; DAVIS, B. M. Neurotrophins, nociceptors, and pain. **Microscopy Research and Technique**, v. 45, p. 252-261, 1999.

MERRILL RL. Central mechanisms of orofacial pain. **Dent Clin North Am**. 2007 Jan;51(1):45-59, v. Review.

MERSKEY H, BOGDUK N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2nd ed. Seattle: IASP Press; 1994.

MI WL, MAO-YING QL, WANG XW, LI X, YANG CJ, JIANG JW, YU J, WANG J, LIU Q, WANG YQ, WU GC. Involvement of spinal neurotrophin-3 in electroacupuncture analgesia and inhibition of spinal glial activation in rat model of monoarthritis. **J Pain**. 2011 Sep;12(9):974-84.

MICHAEL GJ, AVERILL S, NITKUNAN A, RATTRAY M, BENNETT DL, YAN Q, PRIESTLEY JV. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. **J Neurosci**. 1997 Nov 1;17(21):8476-90.

MILLAN MJ. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**. 1999 Jan;57(1):1-164. Review.

MILLS CD, NGUYEN T, TANGA FY, ZHONG C, GAUVIN DM, MIKUSA J, GOMEZ EJ, SALYERS AK, BANNON AW. Characterization of nerve growth factor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in rats. **Eur J Pain**. 2013 Apr;17(4):469-79.

MU, X.; SILOS-SANTIAGO, I.; CARROLL, S. L.; SNIDER, W.D. Neurotrophin receptor genes are expressed in distinct patterns in developing dorsal root ganglia. **J Neurosci**, v. 13, p. 4029-4041, 1993.

NAKAHASHI Y, KAMIYA Y, FUNAKOSHI K, MIYAZAKI T, UCHIMOTO K, TOJO K, OGAWA K, FUKUOKA T, GOTO T. Role of nerve growth factor-tyrosine kinase receptor A signaling in paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats. **Biochem Biophys Res Commun**. 2014 Feb 14;444(3):415-9.

NICKEL FT, SEIFERT F, LANZ S, MAIHÖFNER C. Mechanisms of neuropathic pain. **Eur Neuropsychopharmacol**. 2012 Feb;22(2):81-91.

NIKOLETOPOULOU V, LICKERT H, FRADE JM, RENCUREL C, GIALONARDO P, ZHANG L, BIBEL M, BARDE YA. Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. **Nature**. 2010 Sep 2;467(7311):59-63. doi: 10.1038/nature09336. PubMed PMID: 20811452.

NYKJAER A, WILLNOW TE. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. **Trends Neurosci**. 2012 Apr;35(4):261-70. doi: 10.1016/j.tins.2012.01.003. Epub 2012 Feb 16. Review. PubMed PMID: 22341525.

OBATA K, KATSURA H, MIZUSHIMA T, YAMANAKA H, KOBAYASHI K, DAI Y, FUKUOKA T, TOKUNAGA A, TOMINAGA M, NOGUCHI K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J Clin Invest**. 2005 Sep;115(9):2393-401. Epub 2005 Aug 18. Erratum in: *J Clin Invest*. 2010 Jan;120(1):394. PubMed PMID: 16110328; PubMed Central PMCID: PMC1187934.

OBATA K, TSUJINO H, YAMANAKA H, YI D, FUKUOKA T, HASHIMOTO N, YONENOBU K, YOSHIKAWA H, NOGUCHI K. Expression of neurotrophic factors in the dorsal root ganglion in a rat model of lumbar disc herniation. **Pain**. 2002 Sep;99(1-2):121-32. PubMed PMID: 12237190.

OBERMANN M, RODRIGUEZ-RAECKE R, NAEGEL S, HOLLE D, MUELLER D, YOON MS ET AL. Gray matter volume reduction reflects chronic pain in trigeminal neuralgia. **NeuroImage**. 2013;74:352-8.

OH EJ, YOON YW, LEE SE, HONG SK (2000). Changes in nerve growth factor levels in dorsal root ganglia and spinal nerves in a rat neuropathic pain model. **Exp Brain Res**. 130:93–9.

PAN, M.; NAFTEL, J. P.; WHEELER, E. F. Effects of deprivation of neonatal nerve growth factor on the expression of neurotrophin receptors and brain-derived neurotrophic factor by dental pulp afferents of the adult rat. **Oral Biology**, v. 45, p. 387-399, 2000.

PANFIL, C.; MAKOWSKA, A.; ELLRICH, J. Brainstem and cervical spinal cord Fos immunoreactivity evoked by nerve growth factor injection into neck muscles in mice. **Cephalalgia**, v. 26, p. 128-135, 2006.

PARK KJ, KONDZIOŁKA D, KANO H, BERKOWITZ O, AHMED SF, LIU X, NIRANJAN A, FLICKINGER JC, LUNSFORD LD. Outcomes of Gamma Knife surgery for trigeminal neuralgia secondary to vertebrobasilar ectasia. **J Neurosurg**. 2012 Jan;116(1):73-81. doi: 10.3171/2011.8.JNS11920. Epub 2011 Sep 30. PubMed PMID: 21962163.

PATAPOUTIAN A, REICHARDT LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. **Curr Opin Neurobiol**. 2001 Jun;11(3):272-80. Review. PubMed PMID: 11399424.

PELEGRINI-DA-SILVA A, OLIVEIRA MCG, PARADA CA, TAMBELI CH (2008). Nerve growth factor acts with the beta2-adrenoceptor to induce spontaneous nociceptive behavior during temporomandibular joint inflammatory hyperalgesia. **Life Sci**. 83:780–5.

PELESHOK JC, RIBEIRO-DA-SILVA A (2012). Neurotrophic factor changes in the rat thick skin following chronic constriction injury of the sciatic nerve. **Mol Pain**. 8:1.

PERIN-MARTINS A, TEIXEIRA JM, TAMBELI CH, PARADA CA, FISCHER L (2013). Mechanisms underlying transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-mediated hyperalgesia and edema. **J Peripher Nerv Syst**. 18:62-74.

PETERSEN M, SEGOND VON BANCHET G, HEPPELMANN B, KOLTZENBURG M. Nerve growth factor regulates the expression of bradykinin binding sites on adult sensory neurons via the neurotrophin receptor p75. **Neuroscience**. 1998 Mar;83(1):161-8. PubMed PMID: 9466406.

PETIT JH, HERMAN JM, NAGDA S, DIBIASE SJ, CHIN LS. Radiosurgical treatment of trigeminal neuralgia: evaluating quality of life and treatment outcomes. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 2003 Jul 15;56(4):1147-53. PubMed PMID: 12829153.

PEZET, S., MCMAHON, S. B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 507-538, 2006.

PHILLIPS, H. S.; ARMANINI, M. P. Expression of the trk family of neurotrophin receptors in developing and adult dorsal root ganglion neurons. **Biological Sciences**, v. 351, p. 413-416, 1996.

QUINTÃO NL, SANTOS AR, CAMPOS MM, CALIXTO JB. The role of neurotrophic factors in genesis and maintenance of mechanical hypernociception after brachial plexus avulsion in mice. **Pain**. 2008 May;136(1-2):125-33. Epub 2007 Aug 15. PubMed PMID:17706869.

RAMER MS, BISBY MA. Adrenergic innervation of rat sensory ganglia following proximal or distal painful sciatic neuropathy: distinct mechanisms revealed by anti-NGF treatment. **Eur J Neurosci**. 1999 Mar;11(3):837-46. PubMed PMID: 10103077.

RAMER MS, KAWAJA MD, HENDERSON JT, RODER JC, BISBY MA (1998). Glial overexpression of NGF enhances neuropathic pain and adrenergic sprouting into DRG following chronic sciatic constriction in mice. **Neurosci Lett**. 251:53–6.

RAPPAPORT ZH, DEVOR M. Trigeminal neuralgia: the role of self-sustaining discharge in the trigeminal ganglion. **Pain**. 1994;56(2):127-38.

RAPPAPORT ZH, GOVRIN-LIPPMANN R, DEVOR M. An electron-microscopic analysis of biopsy samples of the trigeminal root taken during microvascular decompressive surgery. **Stereotact Funct Neurosurg**. 1997;68(1-4 Pt 1):182-6.

REICHARDT LF. NEUROTROPHIN-REGULATED SIGNALLING PATHWAYS. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 2006 Sep 29;361(1473):1545-64. Review. PubMed PMID: 16939974; PubMed Central PMCID: PMC1664664.

REN K, DUBNER R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nat Med**. 2010 Nov;16(11):1267-76. doi: 10.1038/nm.2234. Epub 2010 Oct 14. PubMed PMID: 20948535; PubMed Central PMCID: PMC3077564.

REN K, DUBNER R. The role of trigeminal interpolaris-caudalis transition zone in persistent orofacial pain. **Int Rev Neurobiol**. 2011;97:207-25. doi: 10.1016/B978-0-12-385198-7.00008-4. Review. PubMed PMID: 21708312; PubMed Central PMCID: PMC3257052.

REN, K.; THOMAS, D. A.; DUBNER, R. Nerve growth factor alleviates a painful peripheral neuropathy in rats. **Brain Research**, v. 699, p. 286-292, 1995.

RIBEIRO-DA-SILVA A, CUELLO AC, HENRY JL. NGF over-expression during development leads to permanent alterations in innervation in the spinal cord and in behavioural responses to sensory stimuli. **Neuropeptides**. 2000 Oct;34(5):281-91. Review. PubMed PMID: 11049732.

RIDÉN, M.; IBÁÑEZ, C. F. Binding of neurotrophin-3 to p75^{NGFR}, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by TrkC. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 10, p. 5623-5627, 1996.

RO LS, CHEN ST, TANG LM, JACOBS JM (1999). Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. **Pain**. 79:265–74.

ROMERO-REYES M, UYANIK JM. Orofacial pain management: current perspectives. **J Pain Res**. 2014 Feb 21;7:99-115. doi: 10.2147/JPR.S37593. eCollection 2014. Review. PubMed PMID: 24591846; PubMed Central PMCID: PMC3937250.

RUEFF A, DAWSON AJ, MENDELL LM. Characteristics of nerve growth factor induced hyperalgesia in adult rats: dependence on enhanced bradykinin-1 receptor activity but not neurokinin-1 receptor activation. **Pain**. 1996 Aug;66(2-3):359-72. PubMed PMID: 8880860.

RUEFF A, MENDELL LM. Nerve growth factor NT-5 induce increased thermal sensitivity of cutaneous nociceptors in vitro. **J Neurophysiol**. 1996 Nov;76(5):3593-6. PubMed PMID: 8930301.

RUKWIED, R.; MAYES, A.; KLUSCHINA, O.; OBREJA, O.; SCHLEY, M.; SCHMELZ, M. NGF induces non-inflammatory localized and lasting mechanical and thermal hypersensitivity in human skin. **Pain**, v. 148, p. 407-413, 2010.

SATO F, AKHTER F, HAQUE T, KATO T, TAKEDA R, NAGASE Y, SESSLE BJ, YOSHIDA A. Projections from the insular cortex to pain-receptive trigeminal caudal subnucleus (medullary dorsal horn) and other lower brainstem areas in rats. **Neuroscience**. 2013 Mar 13;233:9-27. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.024. Epub 2012 Dec 25. PubMed PMID: 23270856.

SCARPI, D.; CIRELLI, D.; CASTRONOVO, G.; ROSINI, P.; OCCHIATO, E. G.; BARTALI, L.; CIEMENTE, A. M.; BOTTEGONI, G.; CAVALLI, A.; DE CHIARA, G.; BONINI, P.; CALISSANO, P.; PALAMARA, A.T.; GARACI, E.; TORCIA, M. G.; GUARNA, A.; COZZOLINO, F. Low molecular weight, non-peptidic agonists of TrkA receptor with NGF-mimetic activity. **Cell Death and Disease**, v. 3, e339, 2012.

SESSLE, BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit Rev Oral Biol Med**. 2000;11(1):57-91. Review. PubMed PMID: 10682901.

SESSLE, BJ. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. **J Oral Rehabil**. 2006 Apr;33(4):243-61. Review. PubMed PMID: 16629880.

SESSLE BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. **Int Rev Neurobiol**. 2011;97:179-206. doi: 10.1016/B978-0-12-385198-7.00007-2. Review. PubMed PMID: 21708311.

SEVCIK MA, GHILARDI JR, PETERS CM, LINDSAY TH, HALVORSON KG, JONAS BM, KUBOTA K, KUSKOWSKI MA, BOUSTANY L, SHELTON DL, MANTYH PW. Anti-NGF therapy profoundly reduces bone cancer pain and the accompanying increase in markers of peripheral and central sensitization. **Pain**. 2005 May;115(1-2):128-41. PubMed PMID: 15836976.

SHANKLAND WE 2nd. The trigeminal nerve. Part I: An over-view. **Cranio**. 2000 Oct;18(4):238-48. Review. PubMed PMID: 11202843.

SHARMA NK, RYALS JM, GAJEWSKI BJ, WRIGHT DE. Aerobic exercise alters analgesia and neurotrophin-3 synthesis in an animal model of chronic widespread pain. **Phys Ther**. 2010 May;90(5):714-25. doi: 10.2522/ptj.20090168. Epub 2010 Mar 25. PubMed PMID: 20338916; PubMed Central PMCID: PMC3171655.

SHINODA, M.; ASANO, M.; OMAGARI, D.; HONDA, K.; HITOMI, S.; KATAGIRI, A.; IWATA, K. Nerve Growth Factor contribution via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 to ectopic orofacial pain. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 19, p. 7145-7155, 2011.

SHU X, MENDELL LM. Acute sensitization by NGF of the response of small-diameter sensory neurons to capsaicin. **J Neurophysiol**. 2001 Dec;86(6):2931-8. PubMed PMID: 11731549.

SHU X, MENDELL LM. Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin. **Neurosci Lett**. 1999 Oct 29;274(3):159-62. PubMed PMID: 10548414.

SILOS-SANTIAGO, I.; MOLLIVER, D. C.; OZAKI, S.; SMEYNE, R. J.; FAGAN, A. M.; BARBACID, M.; SNIDER, W. D. Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. **J Neurosci**, v.15, p. 5929-5942, 1995.

SINDOU, MP. Working area and angle of attack in three cranial base approaches: pterional, orbitozygomatic, and maxillary extension of the orbitozygomatic approach. **Neurosurgery**. 2002 Dec;51(6):1526-7; author reply 1527. PubMed PMID: 12484348.

SINISCALCO, D.; GIORDANO, C.; ROSSI, F. MAIONI, S.; NOVELLIS, V. Role of neurotrophins in neuropathic pain. **Current Neuropharmacology**, v. 9, p. 523-529, 2011.

SIQUEIRA SRDT, ALVES B, MALPARTIDA HMG, TEIXEIRA MJ, SIQUEIRA JTT. Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia. **Neuroscience**. 2009;164(2):573-7.

SIUCIAK JA, ALTAR CA, WIEGAND SJ, LINDSAY RM. Antinociceptive effect of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. **Brain Res**. 1994 Jan 7;633(1-2):326-30. PubMed PMID: 7511037.

STEIN, A. T.; UFRET-VINCENTY, C. A.; HUA, L.; SANTANA, L. F.; GORDON, S. E. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. **J. Gen. Physiol.**, v. 128, p. 509-522, 2006.

STOHLER, CS. Chronic orofacial pain: is the puzzle unraveling? **J Dent Educ.** 2001 Dec;65(12):1383-92. Review. PubMed PMID: 11780657.

SUGIYO S, TAKEMURA M, DUBNER R, REN K. Trigeminal transition zone/rostral ventromedial medulla connections and facilitation of orofacial hyperalgesia after masseter inflammation in rats. **J Comp Neurol.** 2005 Dec 26;493(4):510-23. PubMed PMID: 16304628.

SULLINS, J. S.; CARNES, D. L.; KALDESTAD, R. N.; WHEELER, E. F. Time course of the increase in trk A expression in trigeminal neurons after tooth injury. **Journal of Endocontics**, v. 26, n. 2, p. 88-91, 2000.

SVENSSON P, CAIRNS BE, WANG K, ARENDT-NIELSEN L. Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. **Pain.** 2003 Jul;104(1-2):241-7. PubMed PMID: 12855334.

SVENSSON P, CASTRILLON E, CAIRNS BE. Nerve growth factor-evoked masseter muscle sensitization and perturbation of jaw motor function in healthy women. **J Orofac Pain.** 2008 Fall;22(4):340-8. PubMed PMID: 19090407.

SVENSSON P, WANG MW, DONG XD, KUMAR U, CAIRNS BE. Human nerve growth factor sensitizes masseter muscle nociceptors in female rats. **Pain.** 2010 Mar;148(3):473-80. doi: 10.1016/j.pain.2009.12.009. Epub 2010 Jan 12. PubMed PMID: 20064691.

SVENSSON, P.; CAIRNS, B. E.; WANG, K.; ARENDT-NIELSEN, L. Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. **Pain**, v. 104, p. 241-247, 2003.

SVENSSON, P.; SESSLE, B.J. Orofacial pain. In: Miles T, Nauntofte B, Svensson P, eds. Clinical oral physiology. **Copenhagen: Quintessence**; 2004: 93–140.

TAKEMURA M, SUGIYO S, MORITANI M, KOBAYASHI M, YONEHARA N. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. **Arch Histol Cytol.** 2006 Jun;69(2):79-100. Review. PubMed PMID: 16819148.

TAL, M; LIBERMAN, R. Local injection of nerve growth factor (NGF) triggers degranulation of mast cells in rat paw. **Neurosci Lett.** 1997 Jan 17;221(2-3):129-32. PubMed PMID: 9121681.

TANAKA, M. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. **Eur J Neurosci.** 2004 Nov;20(9):2303-10. PubMed PMID: 15525272.

TANG JS, QU CL, HUO FQ. The thalamic nucleus submedius and ventrolateral orbital cortex are involved in nociceptive modulation: a novel pain modulation pathway. **Prog Neurobiol.** 2009 Dec;89(4):383-9. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.10.002. Epub 2009 Oct 9. Review. PubMed PMID: 19819292.

TAPLEY P, LAMBALLE F, BARBACID M. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. **Oncogene.** 1992 Feb;7(2):371-81. PubMed PMID: 1312698.

TENDER GC, KAYE AD, LI YY, CUI JG. Neurotrophin-3 and tyrosine kinase C have modulatory effects on neuropathic pain in the rat dorsal root ganglia. **Neurosurgery**. 2011 Apr;68(4):1048-55; discussion 1055. doi: 10.1227/NEU.0b013e318208f9c4. PubMed PMID: 21221027.

TENENBAUM HC, MOCK D, GORDON AS, GOLDBERG MB, GROSSI ML, LOCKER D, DAVIS KD. Sensory and affective components of orofacial pain: is it all in your brain? **Crit Rev Oral Biol Med**. 2001;12(6):455-68. Review. PubMed PMID: 11806516.

TENG KK, FELICE S, KIM T, HEMPSTEAD BL. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. **Dev Neurobiol**. 2010 Apr;70(5):350-9. doi:10.1002/dneu.20768. Review. PubMed PMID: 20186707; PubMed Central PMCID: PMC3063094.

TEODORO FC, TRONCO JÚNIOR MF, ZAMPRONIO AR, MARTINI AC, RAE GA, CHICHORRO JG. Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models. **Neuropeptides**. 2013 Jun;47(3):199-206. doi: 10.1016/j.npep.2012.10.005. Epub 2012 Nov 22. PubMed PMID: 23177733.

TER HORST GJ, COPRAY JC, LIEM RS, VAN WILLIGEN JD. Projections from the rostral parvocellular reticular formation to pontine and medullary nuclei in the rat: involvement in autonomic regulation and orofacial motor control. **Neuroscience**. 1991;40(3):735-58. PubMed PMID: 2062440.

THEODOSIOU, M.; RUSH, R. A.; ZHOU, X. F.; HU, D.; WALKER, J. S.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve damage: role of nerve growth factor. **Pain**, v. 81, p. 245-255, 1999.

THOMAS, KL; VILENSKY, JA. The Anatomy of Vascular Compression in Trigeminal Neuralgia. **Clin Anat**. 2013;1-5.

TISEO PJ, KIVITZ AJ, ERVIN JE, REN H, MELLIS SJ. Fasinumab (REGN475), an antibody against nerve growth factor for the treatment of pain: results from a double-blind, placebo-controlled exploratory study in osteoarthritis of the knee. **Pain**. 2014 Jul;155(7):1245-52. doi: 10.1016/j.pain.2014.03.018. Epub 2014 Mar 29. PubMed PMID: 24686255.

TU, W., WANG, W., XI, H., HE, R., GAO, L., & JIANG, S. (2015). Regulation of Neurotrophin-3 and Interleukin-1 β and Inhibition of Spinal Glial Activation Contribute to the Analgesic Effect of Electroacupuncture in Chronic Neuropathic Pain States of Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2015, 642081.

UGOLINI, G.; MARINELLI, S.; COVACEUSZACH, S.; CATTANEO, A.; PAVONE, F. The function neutralizing anti-TrkA antibody MNAC13 reduces inflammatory and neuropathic pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, p. 2985-2990, 2007.

URANO H, ARA T, FUJINAMI Y, HIRAOKA BY. Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain. **Int J**

Med Sci. 2012;9(8):690-7. doi: 10.7150/ijms.4706. Epub 2012 Oct 2. PubMed PMID: 23091405; PubMed Central PMCID: PMC3477677.

VAY L, GU C, MCNAUGHTON PA. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. **Br J Pharmacol.** 2012 Feb;165(4):787-801. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x. Review. PubMed PMID: 21797839; PubMed Central PMCID: PMC3312478.

VOS, B. P.; MACIEWICZ, R. J. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal neuropathic pain. In: Besson JM, Guilbaud G, editors. Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain, **Amsterdam: Elsevier**, p. 147-158, 1991.

VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M.; MACIEWICZ, R. J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. **J Neurosci**, v. 14, p. 2708-2723, 1994.

WANG H, WEI F, DUBNER R, REN K. Selective distribution and function of primary afferent nociceptive inputs from deep muscle tissue to the brainstem trigeminal transition zone. **J Comp Neurol.** 2006 Sep 20;498(3):390-402. PubMed PMID: 16871539.

WANG X, LIANG H, ZHOU C, XU M, XU L. Sensitization induces hypersensitivity in trigeminal nerve. **Clin Exp Allergy.** 2012 Nov;42(11):1638-42. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.04051.x. PubMed PMID: 23106664.

WATANABE, M.; ENDO, Y.; KIMOTO, K.; KATOH-SEMBA, R.; ARAKAWA, Y. Inhibition of adjuvant-induced inflammatory hyperalgesia in rats by local injection of neurotrophin-3. **Neurosci Lett**, v. 282, n. 1-2, 61-64, 2000.

WEINKAUF B, OBREJA O, SCHMELZ M, RUKWIED R. Differential effects of lidocaine on nerve growth factor (NGF)-evoked heat- and mechanical hyperalgesia in humans. **Eur J Pain.** 2012 Apr;16(4):543-9. doi: 10.1016/j.ejpain.2011.08.004. PubMed PMID: 22396083.

WHITE DM. Contribution of neurotrophin-3 to the neuropeptide Y-induced increase in neurite outgrowth of rat dorsal root ganglion cells. **Neuroscience.** 1998 Sep;86(1):257-63. PubMed PMID: 9692759.

WHITE, D. M. Neurotrophin-3 antisense oligonucleotide attenuates nerve injury-induced Ab-fibre sprouting. **Brain Research**, v. 885, p. 79-86, 2000.

WILLIAMS AC, ECCLESTON C, MORLEY S. Psychological therapies for the management of chronic pain (excluding headache) in adults. **Cochrane Database Syst Rev.** 2012 Nov 14;11:CD007407. doi: 10.1002/14651858.CD007407.pub3. Review. PubMed PMID: 23152245.

WILSON-GERWING, T. D.; DMYTERKO, M. V.; ZOCHODNE, D. W.; JOHNSTON, J. M.; VERGE, V. M. Neurotrophin-3 suppresses thermal hyperalgesia associated with neuropathic pain and attenuates transient receptor potential vanilloid receptor-1 expression in adult sensory neurons. **J Neurosci**, v. 25, p. 758-767, 2005.

WILSON-GERWING, T. D.; STUCKY, C. L.; McCOMB, G. W.; VERGE, V. M. Neurotrophin-3 significantly reduces sodium channel expression linked to neuropathic pain states. **Exp Neurol**, v. 213, n. 2, p. 303-314, 2008.

WINSTON J, TOMA H, SHENOY M, PASRICHA PJ. Nerve growth factor regulates VR-1 mRNA levels in cultures of adult dorsal root ganglion neurons. **Pain**. 2001 Jan;89(2-3):181-6. PubMed PMID: 11166474.

WODA A, MOLAT JL, LUCCARINI P. Low doses of N-methyl-D-aspartate antagonists in superficial laminae of medulla oblongata facilitate wind-up of convergent neurones. **Neuroscience**. 2001;107(2):317-27. PubMed PMID: 11731106.

WODA A. Pain in the trigeminal system: from orofacial nociception to neural network modeling. **J Dent Res**. 2003 Oct;82(10):764-8. Review. PubMed PMID:14514753.

WONG H, DONG XD, CAIRNS BE. Nerve growth factor alters the sensitivity of rat masseter muscle mechanoreceptors to NMDA receptor activation. **J Neurophysiol**. 2014 Nov 1;112(9):2275-82. doi: 10.1152/jn.00327.2014. Epub 2014 Aug 13. PubMed PMID: 25122708.

WOOLF CJ, MA QP, ALLCHORNE A, POOLE S. Peripheral cell types contributing to the hyperalgesic action of nerve growth factor in inflammation. **J Neurosci**. 1996 Apr 15;16(8):2716-23. PubMed PMID: 8786447.

WOOLF, C. J.; MA, Q. P.; CRILLY, P.; WINTER, J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. **Neuroscience**, v. 62, p. 327-331, 1994.

WRIGHT, D. E.; SNIDER, W. D. Neurotrophin receptor mRNA expression defines distinct populations of neurons in rat dorsal root ganglia. **Journal of Comparative Neurology**, v. 351, p. 329-338, 1995.

XIAN, C. J.; ZHOU, X. F. Treating skeletal pain: limitations of conventional anti-inflammatory drugs, and anti-neurotrophic factor as a possible alternative. **Nature**, v. 5, n. 2, p. 92-98, 2009.

XIE YF, JIANG XH, SESSLE BJ, YU XM. Development of regional specificity of spinal and medullary dorsal horn neurons. **World J Biol Chem**. 2016 Feb 26;7(1):138-45. doi: 10.4331/wjbc.v7.i1.138. Review. PubMed PMID: 26981202; PubMed Central PMCID: PMC4768117.

YOSHIDA A, DOSTROVSKY JO, SESSLE BJ, CHIANG CY. Trigeminal projections to the nucleus submedialis of the thalamus in the rat. **J Comp Neurol**. 1991 May 22;307(4):609-25. PubMed PMID: 1714465.

ZAKRZEWSKA JM, LINSKEY ME. Trigeminal neuralgia. **BMJ**. 2015 Mar 12;350:h1238. doi: 10.1136/bmj.h1238. Review. PubMed PMID: 25767102.

ZAKRZEWSKA JM, MCMILLAN R. Trigeminal neuralgia: the diagnosis and management of this excruciating and poorly understood facial pain. **Postgrad Med J**. 2011;87(1028):410-6.

ZHANG, X.; HUANG, J.; McNAUGHTON, P. A. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. **The EMBO Journal**, v. 24, p. 4211-4223, 2005.

ZHOU J, ZHANG F, ZHANG Y. Corticosterone inhibits generation of long-term potentiation in rat hippocampal slice: involvement of brain-derived neurotrophic factor. **Brain Res.** 2000 Dec 8;885(2):182-91. PubMed PMID: 11102572.

ANEXO 1 - COMPROVANTE DA APROVAÇÃO DO ESTUDO PELA CEUA/BIO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 734

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.040351/2013-16

APROVADO: 24/10/2013 – R.O. 09/2013

TÍTULO: Participação dos fatores neurotróficos, fator de crescimento do nervo e neurotrofina-3 no processamento nociceptivo orofacial em ratos

AUTORES: Juliana Geremias Chichorro, Renata Cristiane dos Reis, Carina Fernanada Mattedi Nones, Caroline Machado Kopruszinski

DEPARTAMENTO: Farmacologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA